

Expression von Adhäsionsmolekülen auf Neuroblastomzellen

Einfluss von Histondeacetylasehemmern
und proinflammatorischen Zytokinen

Katharina Graf

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Expression von Adhäsionsmolekülen
auf Neuroblastomzellen –
Einfluss von Histondeacetylasehemmern
und proinflammatorischen Zytokinen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Katharina Graf, geb. Hees
aus Haiger

Gießen 2014

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Neurologische Klinik
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktor:
Prof. Dr. Manfred Kaps

Gutachter: Prof. Dr. Blaes

Gutachter: Prof. Dr. Geyer

Tag der Disputation: 04.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Neuroblastom	6
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	6
1.1.2 Stadieneinteilung	7
1.1.3 Histologie	7
1.1.4 Prognose	8
1.1.5 Therapie.....	8
1.2 Adhäsionsmoleküle	9
1.2.1 N-CAM (CD 56)	9
1.2.2 ICAM-1 (CD 54).....	9
1.2.3 NGFR (nerve growth factor receptor).....	10
1.2.4 CNTN4 (BIG-2)	10
1.2.5 MHC-I (major histocompatibility complex class 1)	11
1.3 Immunsystem	12
1.3.1 Monozyten/Makrophagen	12
1.3.2 Zytokine	13
1.3.2.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)	13
1.3.2.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)	14
1.3.2.3 Interferon- γ (IFN γ).....	15
1.3.2.4 LPS (Lipopolysaccharid).....	15
1.4 Histondeacetylasehemmer Valproinsäure (Valproat)	16
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	18
 2. Material und Methoden	 19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Zellkultur	22
2.2.1.1 Zelllinien	22
2.2.1.2 Kultivierung	22

2.2.1.3 Passagierung.....	23
2.2.1.4 Einfrieren der Zellen	23
2.2.1.5 Auftauen der Zellen.....	23
2.2.1.6 Ausplattieren der Zellen	24
2.2.1.7 Stimulation der Zellen.....	24
2.2.2 RNA-Isolation	25
2.2.3 Messung des RNA-Gehaltes	25
2.2.4 RT-PCR (reverse transcriptase- PCR).....	26
2.2.5 Polymerase chain reaction (PCR).....	26
2.2.5.1 Real time PCR mit dem LightCycler	27
2.2.5.1.1 Nachweis des Amplifikationsproduktes durch SYBRGreen	28
2.2.5.1.2 Reaktionsansatz für Real time PCR	28
2.2.5.1.3 Primer	29
2.2.5.1.4 Real time PCR Bedingungen.....	29
2.2.5.1.5 Auswertung der Real time PCR	30
2.2.6 Gelelektrophorese.....	33
2.2.7 Durchflusszytometrie	34
2.2.7.1 Zellaufbereitung	34
2.2.7.2 Antikörper	35
2.2.7.3 Analyse und Darstellung	35
2.3 Verwendete Software	36
2.4 Statistische Auswertung	37
3. Ergebnisse	38
3.1 MHC-I	38
3.2 ICAM -1 (CD 54).....	42
3.3 NCAM (CD 56).....	47
3.4 NGFR	51
3.5 CNTN-4.....	55
4. Diskussion	58
4.1 MHC-I	59

4.2 ICAM-1	61
4.3 N-CAM.....	63
4.4 NGFR	64
4.5 CNTN-4.....	66
4.6 Methodendiskussion.....	68
4.6.1 Durchflusszytometrie	68
4.6.2 Real time PCR.....	69
 I. Zusammenfassung	 71
II. Summary	72
 III. Literaturverzeichnis	 73
 Anhang	
Abbildungsverzeichnis	85
Tabellenverzeichnis.....	87
Abkürzungsverzeichnis	88
Lebenslauf	89
Danksagung	91
 IV. Ehrenwörtliche Erklärung.....	 92

1. Einleitung

1.1 Neuroblastom

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen vom autonomen Nervengewebe ausgehenden Tumor, dessen Zellen als Neuroblasten bezeichnet werden, da sie in ihrer Entwicklung in einem unreifen Stadium verblieben sind. Das Neuroblastom kann sich im Nebennierenmark oder paravertebral manifestieren. Das Auffallende dieses fast nur bei Kindern vorkommenden Tumors ist das breite Spektrum seiner klinischen Verhaltensweise. Einige dieser Tumoren erleben eine spontane Regression oder differenzieren sich zu gutartigen Ganglioneuromen (Evans et al., 1976, D'Angio et al., 1971, Haas et al., 1988), während andere trotz maximaler multimodaler Therapien eine hohe Mortalität aufweisen (Maris et al., 1999, Matthay et al., 1999). Diese klinische Vielfalt korreliert mit zahlreichen klinischen und biologischen Faktoren, wie Tumorstadium, Alter des Kindes, Tumorhistologie und genetischen Abweichungen (Brodeur et al., 1993, Evans et al., 1987).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor und die dritthäufigste Malignomerkrankung (6,6%) im Kindesalter (Miller et al., 1994). Die Inzidenz des Neuroblastoms betrug, nach Altersstandardisierung in Deutschland in den Jahren 1997-2003, 1,3 Fälle pro 100.000 Kinder unter 15 Jahren pro Jahr, wobei keine geschlechtliche Disposition festgestellt werden konnte (Kaatsch et al., 2008). Das mediane Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 15 Monaten, weltweit bei 18 Monaten (Kaatsch et al., 2008, Brodeur et al., 1984). In Deutschland leben nach 5 Jahren noch 78 % der Patienten, nach 10 Jahren noch 75 % (Kaatsch et al., 2008).

Die Ätiologie des Neuroblastoms ist unbekannt. Bisher konnten auch keine Auslöser identifiziert werden (Ries et al., 1999). Es tritt zumeist sporadisch auf, wobei in 1- 2 % der Fälle eine familiäre Häufung zu beobachten ist, deren genaue genetische Abweichung jedoch noch nicht identifiziert werden konnte. Allerdings bleibt auch in diesen Fällen die biologische und klinische Heterogenität erhalten (Kuschner et al., 1986, Maris et al., 2000).

1.1.2 Stadieneinteilung

Das Neuroblastom wird nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS) in vier Stadien unterteilt (Brodeur et al., 1993).

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung des Neuroblastoms

Stadium 1	Lokalisierter, makroskopisch komplett resezierbarer Tumor; repräsentativer ipsilateraler Lymphknoten histologisch tumorfrei (mitresezierte Lymphknoten dürfen Tumor-positiv sein)
Stadium 2a	Lokalisierter, inkomplett resezierbarer Tumor; repräsentative ipsilaterale nichtadhärente Lymphknoten histologisch tumorfrei
Stadium 2b	Lokalisierter Tumor; Tumorbefall eines ipsilateralen nichtadhärenten Lymphknotens, kontralaterale Lymphknoten histologisch tumorfrei
Stadium 3	Nicht-resektabler unilateraler Tumor, der die Wirbelsäule überschreitet, mit oder ohne regionaler Lymphknotenbeteiligung Oder lokalisierter unilateraler Tumor mit kontralateraler Lymphknotenbeteiligung Oder Mittellinientumor mit bilateraler infiltrativer Ausdehnung oder Lymphknotenbeteiligung
Stadium 4	Disseminierte Tumorerkrankung mit Befall von Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Haut, Leber und/oder anderen Organen
Stadium 4S	Lokalisierter Primärtumor wie in Stadium I oder II beschrieben mit Dissemination begrenzt auf Leber, Haut und Knochenmark (nur Kinder < 12 Monaten; nur geringe Knochenmarksinfiltration (<10% Tumorzellen im Ausstrich, MIBG-Szintigrafie für Knochenmark negativ))

1.1.3 Histologie

Neuroblastome sind meist lobulierte, graurote Tumoren, die Nekrosen und Verkalkungen aufweisen und zu größeren Blutungen neigen. Die Kerne sind hyperchromatisch und die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben. Sogenannte Pseudorosetten sprechen für eine beginnende Differenzierung. Auch die Bildung einer feinfibrillären Matrix und einzelner reifer Ganglienzellen spricht für eine Differenzierung. Bei stärkerer Ausreifung mit vielen Ganglienzellen handelt es sich um ein sogenanntes Ganglioneuroblastom. Kommen im Tumor nur reife Strukturen, wie Ganglienzellen, Schwann-Zellen und Neurofibrillen vor, so handelt es sich um ein Ganglioneurom, welches als potentiell benignes Endstadium der Erkrankung gilt (Böker/Denk/Heitz – Pathologie, 3. Auflage, Kap. 40.7.1, Urban&Fischer).

1.1.4 Prognose

Der wichtigste prognostische Faktor ist das Stadium der Erkrankung. Als klinisch relevant zeigt sich dabei vor allem das oben gezeigte INSS-Schema (Castleberry et al., 1994). Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist das Alter der Kinder bei Diagnosestellung, denn in allen Stadien der Erkrankung haben Kinder jünger als ein Jahr (bis 85 %) ein signifikant besseres tumorfreies Überleben als Kinder im gleichen Stadium, die älter als ein Jahr sind (bis 40 %). Auch die Histologie des Tumors ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose der Kinder. Die histologischen Besonderheiten werden in einer Klassifikation von Shimada und Kollegen in Zusammenhang gebracht mit der klinischen Verhaltensweise des Tumors und damit der Prognose (Shimada et al., 1984). Das Vorhandensein von N-Myc-Amplifikation gehört ebenfalls zu den Prognostika des Neuroblastoms, da ebendiese mit einem metastasierten Stadium und dementsprechend schlechter Prognose vergesellschaftet ist (Brodeur et al., 1984).

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Neuroblastoms richtet sich in erster Linie nach dem o.g. Stadium der Erkrankung. In den Stadien 1 und 2 wird eine alleinige operative Entfernung des Tumor angestrebt (Perez et al., 2000). Handelt es sich jedoch um höhere Tumorstadien sollte eine Chemotherapie dem operativen Eingriff vorangestellt werden. Bei dieser Chemotherapie handelt es sich meist um die Kombination von alkylierende Substanzen, Anthracyklinen, Etoposid, Melphalan, Cisplatin und Vincaalkaloiden. Im Stadium 4 ist eine Kombinationstherapie mit Operation, Chemotherapie und Bestrahlung bestimmter Tumorlokalisationen vorgesehen. Zusätzlich erfolgt in einigen Fällen eine autologe Stammzelltransplantation. Das Stadium 4S nimmt eine Sonderstellung unter den Neuroblastomen ein, denn in diesem Stadium ist äußerste Zurückhaltung in Bezug auf Therapie geboten da es häufig zu spontanen Regressionen kommt. Allenfalls eine milde Chemotherapie kann in Einzelfällen angebracht sein.

Neuere therapeutische Optionen sind Radiorezeptorthherapie, Retinsäurederivate, haploidente Stammzelltransplantation und die Antikörpertherapie (Matthay et al., 1999).

1.2 Adhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind eine Klasse von Proteinen, die die Kontakte zwischen Zellen in einem Gewebe und zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix vermitteln. Dieser Prozeß spielt vor allem bei Entzündungen und Tumorerkrankungen eine besondere Rolle. Zu den Adhäsionsmolekülen zählen die Cadherine, die Integrine, die Selektine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Sie bestehen meist aus einem intrazellulären, einem extrazellulären und einem transmembranären Bereich. Die intrazelluläre Domäne ist dabei für die Signaltransduktion ins Innere der Zelle zuständig, während die extrazelluläre der eigentlichen Adhäsion dient.

1.2.1 N-CAM (CD 56)

Eine große Gruppe der Adhäsionsmoleküle sind die N-CAMs, welche auf Neuronen, Gliazellen, Skelettmuskelzellen und NK-Zellen vorkommen. N-CAM, „neural cell adhesion molecule“, gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und wird im „cluster of differentiation“ als CD 56 eingeteilt. Es spielt eine Rolle in der Zell-Zell-Interaktion, dem neuronalen Auswuchs, der synaptischen Plastizität, sowie für Lernen und Gedächtnis. CD 56 wird in der Pathologie als immunhistochemischer Marker für bestimmte Tumoren herangezogen. Folgende Tumoren sind CD 56-positiv: Myelome, myeloische Leukämien, neuroendokrine Tumore, der Wilms-Tumor, Neuroblastome, NK/T-Zell-Lymphome, das Phäochromozytom, das Paragangliom und das kleinzellige Bronchialkarzinom. Aufgrund dessen wird N-CAM als Zielmolekül für experimentelle Antikörper-gestützte Immuntherapien genutzt (Perez et al., 2000).

1.2.2 ICAM-1 (CD 54)

Auch ICAM-1 (CD 54) gehört zu den interzellulären Adhäsionsmolekülen der Zelle und kommt auf Leukozyten und Endothelien vor. CD 54 ist ein Ligand für das Integrin LFA-1, welches auf Leukozyten vorkommt und bei Aktivierung die Bindung zwischen Leukozyt und

Endothel herstellt und somit die Einwanderung der Leukozyten ins Gewebe ermöglicht (Jensen et al., 2007, Rothlein et al., 1986). ICAM-1 wird auf zahlreichen Tumoren exprimiert, darunter auch das Neuroblastom (Yang et al., 2005, Guarina et al., 1990). CD 54 nimmt deshalb immer weiter an Bedeutung zu für die Toxizität des Tumors und die metastatische Progression (Kuppner et al., 1990, Webb et al., 1991). Die grundlegende Expression von ICAM-1 ist auf der Mehrzahl der Zellen schwach ausgebildet, lässt sich aber durch proinflammatorische Zytokine, Retinsäure und weitere Substanzen verstärken (Pandolfi et al., 1992; Pober et al., 1986; Rothlein et al., 1986; Jahnke et al., 1994; Cilenti et al., 1995).

1.2.3 NGFR (nerve growth factor receptor)

Der NGF (nerve growth factor) ist ein neurotrophes Protein, welches eine große Bandbreite von biologischen Antworten hervorruft, die für das Überleben, die Entwicklung und die Differenzierung von Neuronen wichtig sind. Seine Wirkung wird durch spezielle Glykoproteine auf der Zelloberfläche vermittelt, die NGFR (Boullion et al., 1991). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass es zwei Formen des NGFR gibt, die sich nur in der Größe der Affinität zum NGF unterscheiden (p75 und p140). Die hochaffine Form des Rezeptors (TrkA) ist verantwortlich für die Internalisierung und biologische Antwort des NGF von anfälligen Neuronen und neuronalen Tumoren (Johnson et al., 1986; Sonnenfield et al., 1985). Es gibt einige Berichte von NGFR-Expression in PNETs (primitive neuroectodermal tumors) und Hirntumoren und widersprüchliche Beweise für die Expression von NGFR in peripheren neuroektodermalen Tumoren (Green et al., 1985; Perosio et al., 1988; Chesa et al., 1988; Perosio et al., 1989). Auch für das Neuroblastom im speziellen spielt der NGFR eine wichtige Rolle, denn er wurde auf kultivierten Neuroblastom-Zelllinien gefunden (Thompson et al., 1989). Auch induziert NGF verschiedene morphologische und biochemische Veränderungen in Neuroblastom-Zelllinien (Marchetti et al., 1987; Haskell et al., 1987).

1.2.4 CNTN-4 (BIG-2)

Contactin4, auch bekannt als BIG-2, ist Mitglied der TAG-1/F3 Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie (Gilber et al., 1984). BIG-2 gehört zu den sogenannten

AxCAMs (Axon-associated cell adhesion molecules), welche eine entscheidende Rolle in der Entstehung, Plastizität und Formbarkeit von neuronalen Netzwerken spielen (Zeng et al., 2002). Das CNTN-4-Molekül ist gekennzeichnet durch sechs extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen, gefolgt von vier extrazellulären Fibronektin Typ III (FN III) Domänen. Die Verankerung mit der Zellmembran wird gewährleistet durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI). Eine Arbeit aus Australien zeigte CNTN-4 als einen Anwärter für die Differenzierungsmöglichkeiten von Neuroblastom-Zellen (Yoshihara et al., 1995). Damit verbunden war auch die Annahme, dass BIG-2 eine Rolle beim Ansprechen von Neuroblastom-Zellen auf differenzierende Agenzien spielen könnte (Hansford et al., 2003).

1.2.5 MHC-I (Major Histocompatibility Complex Class I)

Es handelt sich bei MHC um einen Proteinkomplex, welcher unterschieden wird zwischen einem MHC-Klasse-I- sowie einem MHC-Klasse-II-Proteinkomplex. Beiden kommen unterschiedliche Aufgaben in der Antigenpräsentation für T-Killerzellen und dem Schutz vor dem eigenen Immunsystem zu. Der MHC-I-Proteinkomplex besteht aus einer membrangebundenen größeren Untereinheit, der schweren Kette (heavy chain) sowie einer löslichen Untereinheit, dem β_2 -Mikroglobulin. Es werden insgesamt vier Domänen innerhalb dieses Proteinkomplexes unterschieden. Drei dieser vier Domänen werden von der α -Untereinheit gestellt (α_1 bis α_3) sowie die vierte Domäne durch das β_2 -Mikroglobulin. Eine Grube zwischen α_1 und α_2 dient zur Präsentation von Spaltprodukten synthetisierter Proteine, der sogenannten Peptide. Diese werden von zytotoxischen T-Lymphozyten, genauer den $CD8^+$ T-Zellen, erkannt (Zinkernagel et al., 1974). Abhängig davon ob es sich bei den präsentierten Peptiden um körpereigene oder körperfremde Proteinspaltprodukte handelt, kommt es bei den körperfremden Peptiden zu einer Zytolyse durch die zytotoxischen T-Zellen und zur Ausschüttung von immunregulatorischen Interleukinen. MHC-I zählt also eher zum Immunsystem denn zu den Adhäsionsmolekülen. Der Haupthistokompatibilitäts-Genkomplex befindet sich auf Chromsom 6.

1.3 Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Körper zur Abwehr von fremden Zellen und Antigenen. Man unterscheidet den unspezifischen Teil vom spezifischen Teil. Nur bei voller Funktionstüchtigkeit beider Systeme ist eine optimale Immunabwehr gewährleistet.

Das unspezifische, angeborene Immunsystem besteht aus Natürlichen Killerzellen (NK), sowie den Monozyten/Makrophagen, welche fremde Antigene phagozytieren, um sie auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und damit andere Immunzellen zu aktivieren. Desweiteren sind Monozyten/Makrophagen wesentlich an der Produktion von Zytokinen beteiligt, welche der Steuerung des Immunsystems dienen.

Zum spezifischen, adaptiven Immunsystem gehören die B- und T-Lymphozyten, welche bei Antigenkontakt mit klonaler Selektion und Antikörperbildung reagieren. Ihre Immunantwort ist sehr spezifisch und hinterläßt meist lebenslange Immunität.

1.3.1 Monozyten/Makrophagen

Makrophagen gehören zu den Fresszellen (Phagozyten) und sind als Leukozyten Teil des unspezifischen Immunsystems. Sie sind für die Beseitigung von Mikroorganismen durch Phagozytose zuständig. Die Vorläufer der Makrophagen, die Monozyten entwickeln sich im Knochenmark und wandern in die Blutgefäße ein, mit welchen sie im Körper für 8-70 Stunden zirkulieren (Whitelaw et al., 1966). Aus der Blutbahn gelangen die Monozyten ins Gewebe, wo sie sich gewebespezifisch ausdifferenzieren und mehrere Jahre persistieren können (Van Furth et al., 1968).

Durch Phagozytose können Fremdartigene intrazellulär verarbeitet und CD4+-Lymphozyten über HLA-DR Moleküle, die zum MHC Klasse II-Komplex gehören, präsentiert werden (Nathan et al., 1980). Auch werden nach Aktivierung der Monozyten Zytokine von diesen ausgeschüttet, die ebenfalls an der Steuerung des Immunsystems wesentlichen Anteil haben.

Die Aktivierung der Monozyten kann durch verschiedene Zytokine, Mikroorganismen oder deren Abbauprodukte ausgelöst werden (Nathan et al., 1987). Die Bindung an Monozyten erfolgt in erster Linie über den CD14-Rezeptor, welcher charakteristisch für diese Zellpopulation ist. Bei Bindung an den Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, an deren Ende es zu einer Aktivierung von NF- κ B kommt, welcher wiederum in den Nukleus einwandert um dort die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen zu aktivieren.

Diese Zytokine werden dann neben anderen Faktoren, wie Gerinnungsfaktoren, Enzyme und Wachstumsfaktoren von den Makrophagen sezerniert (Janeway et al., 1997).

Über diese verschiedenen Wege nehmen die Monozyten/Makrophagen aktiv an der Steuerung des Immunsystems teil.

1.3.2 Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe, die Informationen zwischen Zellen vermitteln, weshalb sie auch als großes Netzwerk des Immunsystems angesehen werden können (Balkwill et al., 1989). Zu ihnen gehören die Lymphokine, Monokine, Interleukine (IL) und Interferone (IFN). Zytokine wirken autokrin, parakrin, juxtakrin, aber nur selten endokrin. Zytokine eines Typs können von verschiedenen Zellen sezerniert werden. Sie besitzen ein niedriges Molekulargewicht und steuern Dauer und Intensität der Entzündungsreaktion (Dinarello et al. 2000).

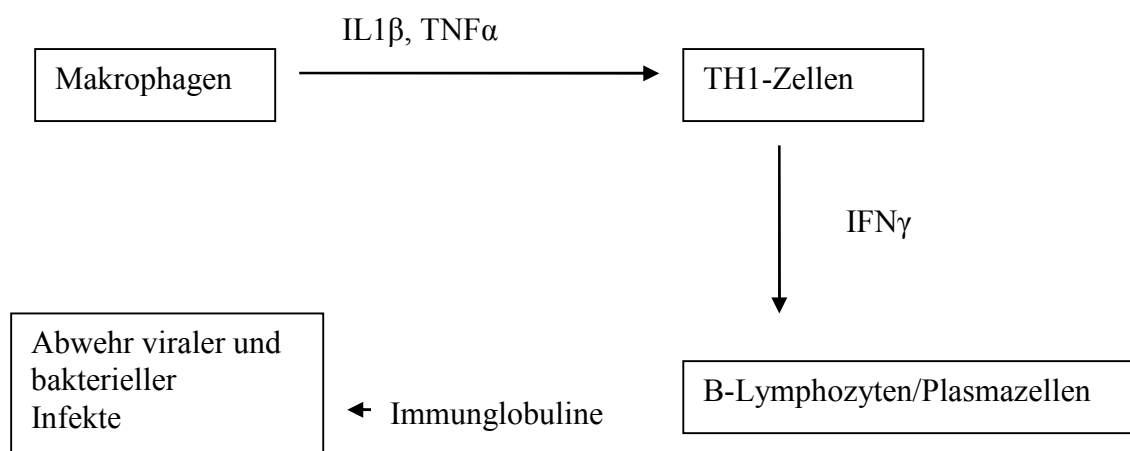


Abb. 1: Übersicht über Funktion und Sezernierung ausgewählter proinflammatorischer Zytokine

1.3.2.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

TNF α gilt als einer der Hauptmediatoren der Inflammation und wird mit einer Vielzahl von infektiösen und nicht-infektiösen entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Stricter et al., 1993). TNF α wird hauptsächlich von Makrophagen sezerniert, wobei auch

andere Zellen, wie Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Neurone, Astrozyten und Ependymzellen TNF α sezernieren können (Goldfeld et al., 1991; Chung et al., 1990; Wilkinson et al., 1991). Trigger einer starken Ausschüttung von TNF α sind vor allem Lipopolysaccharide, Interleukin-1 β und andere bakterielle Produkte. Da TNF α sehr schnell von den Makrophagen ausgeschüttet wird, erreichen die Plasmaspiegel des Zytokins schon nach einer Stunde Maximalwerte. Die Wirkungen von TNF α im Organismus sind sehr vielfältig. Zunächst bewirkt es eine Vermehrung von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel, wodurch Leukozyten leichter andocken und in entzündliche Gebiete einwandern können. Eine weitere Wirkung am Gefäßendothel ist die Anregung desselben zur Ausschüttung eigener Zytokine, welche die Chemotaxis fördern. Im Knochenmark kommt es unter dem Einfluß von TNF α zu einer vermehrten Bildung und Freisetzung von Leukozyten. Auch die Hepatozyten werden zur Produktion von Akut-Phase-Proteinen angeregt. Im Hypothalamus bewirkt TNF α durch die Verstärkung der Prostaglandinsynthese Fieber (Turnbull et al., 1997). TNF α hat außerdem Auswirkungen auf Muskel- und Fettzellen, den Zuckerstoffwechsel und das Myokard. Auf die Makrophagen selbst wirkt es wiederum über eine Steigerung der Phagozytose (Blackwell et al., 1996). Hohe systemische Konzentrationen von TNF α können zu einer Schocksymptomatik führen. Die Wirkung von TNF α wird über die beiden bisher bekannten Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt, welche nach Ablauf einer speziellen Signalkaskade zu einer Aktivierung von NF- κ B führen.

1.3.2.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen produziert und gehört zur Interleukin-1-Familie. Es wird als inaktiviertes Vorläuferprotein transkribiert und kann durch endogene und exogene Pyrogene, wie das Lipopolysaccharid, aktiviert werden. IL-1 β bewirkt einen Fieberanstieg über seine Wirkung am Hypothalamus (Sapolsky et al., 1987; Rivest et al., 1992). Im Knochenmark kommt es zur Vermehrung neutrophiler Granulozyten, Hepatozyten produzieren mehr Akut-Phase-Proteine und auch die Freisetzung von Interleukin-6 wird getriggert. Diese verschiedenen Wirkungen werden über die beiden Interleukin-1-Rezeptoren vermittelt. Der IL1R1, der praktisch auf allen Zellen zu jeder Zeit vorkommt ist kaum reguliert, weshalb der Organismus den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten bildet. Der IL1R2 hingegen bindet zwar das Interleukin gibt aber dessen Signal nicht weiter und wirkt so ebenfalls als Gegengewicht zum IL1R1.

1.3.2.3 Interferon- γ (IFN γ)

T-Helfer-Lymphozyten werden durch Interleukin-1 β , TNF α und einige andere Zytokine zur Proliferation und Differenzierung in TH1- und TH2-Zellen angeregt. Die so entstandenen TH1-Zellen sezernieren IFN γ um damit hauptsächlich B-Lymphozyten/Plasmazellen zur Bildung von Immunglobulinen der Klassen IgG1 und IgG3 anzuregen. IFN γ kann aber auch von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen gebildet werden. Neben der Wirkung auf B-Lymphozyten wirkt IFN γ auch noch auf die Makrophagen zurück und sorgt so für eine verstärkte Phagozytoseaktivität und eine Expression von Aktivierungsmarkern und MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Makrophagen zur besseren Antigenpräsentation.

1.3.2.4 Lipopolysaccharide (LPS)

Lipopolysaccharide sind Verbindungen aus Bestandteilen von Zuckern (Sacchariden) und Fetten (Lipiden), die in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten sind. Sie werden zur serologischen Charakterisierung und Identifizierung dieser Bakterien herangezogen und wirken als Antigene. Zerfallen diese gramnegativen Bakterien, so werden Teile der Lipopolysaccharide frei und nun als Endotoxine bezeichnet, da sie toxisch wirken und nicht von intakten Bakterien abgegeben werden. LPS bestehen aus drei Teilbereichen. Lipid A, welches als Endotoxin wirkt und je nach Bakterienart variieren kann. Kernregion, die ebenfalls je nach Bakterienart verschieden sein kann und aus einer inneren und äußeren Kernregion besteht. Der dritte Teil ist das Polysaccharid, welches sehr kurz sein kann oder auch fehlen kann. Das Polysaccharid ist außerdem die Region, die als Antigen funktioniert und zur Differenzierung der Bakterienarten genutzt wird.

Gelangt nun das Endotoxin des LPS in den Blutstrom, so bindet es sehr schnell an das lipopolysaccharid binding protein (LBP), ein 60-kD Glykoprotein, welches auch als Septin bekannt ist (Wright et al., 1990). Das LBP vermittelt nun die Bindung des Komplexes an den Membranrezeptor CD-14, welcher vor allem auf Monozyten exprimiert wird und als Zielmolekül für das Endotoxin LPS gilt. CD-14 sorgt nun durch eine Aktivierung von NF- κ B für die Freisetzung der Zytokine TNF α und IL-1 β , deren eigene Wirkungen in einem eigenen Kapitel schon beschrieben wurden (Rivest et al., 2000). Zusätzlich sorgt TNF α über eine positive Rückkopplung für eine vermehrte CD-14-Expression. CD-14 wird außerdem auf

Zellen des Gehirns, nämlich in der Mikroglia, im Plexus choroideus und entlang der Blutgefäße, exprimiert. Auch dort führt LPS durch eine Induktion des Rezeptors zu einer vermehrten Zytokinproduktion (Rivest et al., 2000).

1.4 Histondeacetylasehemmer Valproinsäure (Valproat, VPA)

Valproinsäure ist ein Antiepileptikum und gehört zur Gruppe der Histondeacetylasehemmer. Die antiepileptische Wirkung wird durch die Hemmung erregender Ionenkanäle und der Verstärkung des hemmenden Neurotransmitters GABA hervorgerufen (Bowden, 2003). Valproat wirkt außerdem epigenetisch, da es durch die Hemmung von Deacetylierungen in das epigenetische System eingreifen kann. Hierbei erfolgt die Verhinderung einer Deacetylierung von Histonen, welche für die Anordnung der DNA zuständig sind. Durch eine vermehrte Deacetylierung wird eine stärkere Auflockerung zwischen DNA und Histon hervorgerufen, wodurch eine Transkription von DNA-Abschnitten erfolgen kann, welche zur Tumorentstehung beitragen. Die Vermeidung der Deacetylierung führt damit zur Verhinderung dieses Mechanismus durch eine stärkere Bindung zwischen DNA und Histon wodurch es zu einer Veränderung der Expression von Genen und zur Apoptose kommt. Diese epigenetische Eigenschaft führt zu einer Reihe von unerwünschten Wirkungen des Valproats, macht es aber zum anderen interessant für die Krebstherapie.

Valproinsäure ist Mittel der ersten Wahl bei generalisierter Epilepsie und wird vor allem zur Behandlung von Aufwach-Grand-Mal, Absencen und myoklonischen Epilepsien eingesetzt (Johannessen, 2000). Ebenfalls eingesetzt wird Valproat zur Stimmungsaufhellung und bei Migräne (Tumicliiff, 1999; Phiel et al., 2001).

Die Nebenwirkungen von Valproat sind vielfältig, zu ihnen gehören Schläfrigkeit, Tremor, Stupor, Haarausfall, Muskelhypotonie, vermehrte Speichelbildung, Hörstörungen, Kopfschmerzen, Verwirrtheit, Thrombozytopenie, Enzyminhibition, Stoffwechselstörungen und Schädigungen von Leber, Niere und Bauchspeicheldrüse. Nach Langzeittherapie kann es zu einer Enzephalopathie mit Einschränkungen der kognitiven Leistungsfähigkeit kommen.

Eine Einnahme von Valproinsäure in der Schwangerschaft kann zu schweren Mißbildungen des Fetus, wie Neuralrohrdefekten und Enzephalopathien, führen, da Valproat eine stark teratogene Wirkung hat (Robert, 1982; Robert et al., 1982; Davies, 1995)

In verschiedenen Studien konnte auch ein Effekt der Valproinsäure auf das Immunsystem gezeigt werden. Jedoch werden die einzelnen Wirkungen kontrovers diskutiert (Fujiwara et al., 1983; Joubert et al., 1977; Queiroz et al., 1992; Ichiyama et al., 2000)

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Prognose des Neuroblastoms könnte neben den bekannten histopathologischen Veränderungen, dem Stadium der Erkrankung und dem Alter der Patienten auch von entzündlichen Infiltraten im Tumorgewebe abhängig sein. Wenn diese inflammatorischen Infiltrate eine Rolle für die Prognose spielen sollten, gilt ein besonderes Interesse den Signalwegen der Zelle und damit den Adhäsionsmolekülen, über welche diese inflammatorische Reaktion weitergegeben wird. Unter dem therapeutischen Aspekt spielt vor allem die Beeinflussung dieser Signalwege durch proinflammatorische Zytokine und weitere Agenzien eine entscheidende Rolle.

1. Werden die oben genannten Oberflächenmoleküle MHC-I, N-CAM (CD 56), ICAM-1 (CD 54), NGFR und CNTN-4 (BIG-2) auf der Oberfläche der Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-SH exprimiert?
2. Zeigt sich im Vergleich zur Nicht-Neuroblastom-Kontrolle HEK-293 ein Effekt proinflammatorischer Zytokine oder des Histondeacetylasehemmers Valproat auf diesen basalen Expressionslevel der einzelnen Oberflächenmoleküle?
3. Welche der Stimulantien $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, LPS und VPA zeigen den stärksten Effekt auf die Expression der Oberflächenmoleküle?
4. Können die Effekte sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden?
5. Zeigen sich Unterschiede der beiden Zelllinien bezüglich der Stimulationseffekte und des basalen Expressionslevels der Oberflächenmoleküle?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank:	MCO-20 AIC (SANYO Biomedical, Bad Nenndorf)
Steribank:	Class II Type A/B3 (NUAIRE, Plymouth, USA)
Wasserbad:	(Memmert, Kammerstein)
Mikroskop:	(Krüss Optronic, Hamburg)
Gefrierschrank:	Santo (AEG Electrolux, Stockholm, Schweden)
Gefrierschrank:	(Bosch, Stuttgart)
PCR-Gerät:	Tpersonal (Biometra, Göttingen)
PCR-Gerät:	My Cycler, thermal cycler (BIO-RAD, München)
Real-Time PCR-Gerät:	LightCycler [®] , Serien-Nr. 1400757 (Roche, Basel, Schweiz)
Zentrifuge:	Mikro-120 (Hettich, Tuttlingen)
Zentrifuge:	Universal 32R (Hettich, Tuttlingen)
Zentrifuge:	2- G (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Spectrophotometer:	Smart-Spec Plus (BIO-RAD, München)
FACS-Gerät:	FacsCalibur [™] (Becton Dickinson, Heidelberg)
Mikrowelle:	(SHARP Electronics, Hamburg)
Ph-Meter:	(Schott Geräte, Ludwigshafen)
Vortexer:	MS1 Minishaker (IKA [®] , Staufen)
Waage:	FI 210-G (Fischer, Goslar)
PCR-Kühlblock:	LightCycler Centrifuge Adapters (Roche, Basel, Schweiz)
Pipetten:	verschiedene Volumen (Eppendorf, Hamburg)
Gelkammer:	Class II (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Gefriertruhe:	REVCO (Hettich, Tuttlingen)
Geldokumentationsanlage:	Image Masters VDS (Pharmacia Biotech.)
Spannungsquellen:	(Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen:	75cm ² ; Cellstar (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
6-well-Platten:	Cellstar [®] 657160 (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
Filter:	Minisart; 0,2 µm; single-use-filter (Sartorius Stedim, Göttingen)
Pipettenspitzen:	Cellstar [®] 5ml; 10ml; 25ml (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
Medium:	RPMI 1640+ GlutaMAX-I (GIBCO, Berlin)
Trypsin:	5% Trypsin-EDTA; 10x (GIBCO, Berlin)
FBS:	Foetal Bovine Serum (PAA, Pasching, Österreich)
PBS:	DPBS (CaCl ₂ , MgCl ₂); 10x (GIBCO, Berlin)
DMSO:	(Carl Roth GmbH)
Penicillin/Streptomycin:	Penicillin/Streptomycin; 100 ml (GIBCO, Berlin)
Bluecap:	50 ml; 15 ml (Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich)
Cryoröhrchen:	Cryo Tube [™] Vials (NUNC, Zürich, Schweiz)
RNA-Isolations-Kit:	NucleoSpin [®] RNA II (Machery-Nagel, Düren)
Reverse Transkriptase:	Revert Aid M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot)
Ribonuklease-Inhibitor:	Ribolock Ribonuclease Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot)
Oligonukleotid Primer:	Oligo dT Primer (Fermentas, St. Leon-Rot)
dNTP-Mix:	dNTP- Mix 10 mM (Fermentas, St. Leon-Rot)
Puffer:	10 x Reaction Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
H ₂ O:	DEPC-treated Water (Fermentas, St. Leon-Rot)
Kapillaren:	LightCycler Capillaries; 20 µl (Roche, Basel, Schweiz)
PCR Kit:	Quantifast SybrGreen PCR Kit (Qiagen, Hilden)
Pipettenspitzen:	10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl; steril (Nerbe plus, Winsen/Luhe)
Ethanol	100% (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Ethidiumbromid	(Merck, Darmstadt)
RNAse-freies Wasser	(Appllichem, Darmstadt)
FACS-Röhrchen	0,5 ml, 38 x 6,5 mm PS (Sarstedt, Sevelen)
FACS-Röhrchen groß	Falcon [®] 5 ml Polystyrene Tube (Becton Dickinson, Heidelberg)
96-well-Platte	Cellstar [®] 96 well cell culture plate, sterile (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
FACS-Puffer	500 ml PBS, 5 ml NaN ₃ , 5 ml FCS

FACSClean	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACSFlow	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACSRinse	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Pipettenspitzen	unsteril (Eppendorf, Hamburg)
Dest. Wasser	Aqua B. Braun (Braun, Melsungen)
Farbstoff	6 x Loading Dye Solution (Fermentas, St. Leon-Rot)
Agarosegel	(Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
DNA-Marker	HypperLadder-I, 100 lanes (Bioline, New Jersey, USA)
Küvetten:	220-1600 nm (Eppendorf, Hamburg)
Handschuhe:	NobaGlove [®] -Latex puderfrei (NOBA GmbH, Wetter/Ruhr)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

1. HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen stammen von primären humanen embryonalen Nierenzellen ab und wurden durch Transformation mit Adenovirus-Typ-5-Fragmenten immortalisiert (Graham et al., 1977). Die Zellen wachsen fibroblastenartig als Monolayer und exprimieren neben Cytokeratinen und Vimentin auch Neurofilamente.

2. SH-SY5Y-Zellen

Bei SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die als Sublinie aus der Neuroepithelom-Zelllinie SK-N-SH hervorgegangen ist. SH-SY5Y-Zellen sind sympathische adrenerge Ganglienzellen (Scott et al., 1986). Sie wachsen epithel-artig als Monolayer und exprimieren Neurofilamente und Vimentin.

3. SK-N-SH-Zellen

Humane Neuroblastom-Zelllinie (Sadee et al., 1987), die 1970 aus der Knochenmarksbiopsie eines vierjährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom im Stadium IV nach Evans isoliert wurden (Biedler et al., 1973).

2.2.1.2 Kultivierung

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen in Kulturmedium bei 37°C, 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert und je nach Dichte des Zellrasens 2-3 mal pro Woche passagiert. Zum Ansetzen des Kulturmediums wurde das von GIBCO gelieferte Medium RPMI 1640+ GlutaMAX-I mit 10 % hintzeinaktiviertem FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.2.1.3 Passagierung

Zum Passagieren der Zellen wurde das gebrauchte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 4 ml 1 x Trypsin für 4 Minuten inkubiert. Das Trypsin wurde dann mit der doppelten bis dreifachen Menge Kulturmedium neutralisiert. Die Zellen wurden nun bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 4 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit der gewünschten Menge Kulturmedium auf die zwei- bis zehnfache Kulturfläche ausplattiert.

2.2.1.4 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Passagieren aus den Zellkulturflaschen gelöst. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen nicht in Kulturmedium sondern in 1 ml Gefrierstock resuspendiert und zu je 0,5 ml in ein Cryoröhrchen gegeben und nach langsamer Abkühlung bei -80°C gelagert.

Der Gefrierstock wird aus 18 ml FCS + 2 ml steril-filtrierte DMSO gemischt.

2.2.1.5 Auftauen der Zellen

Die Cryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C rasch erwärmt und anschließend zusammen mit dem Gefrierstock in 0,5 ml Kulturmedium aufgenommen. Das Gemisch wurde in ein 50 ml Bluecap gegeben und nun wurden langsam 10 ml Kulturmedium und dann schneller nochmals 10 ml Kulturmedium hinzupipettiert. Anschließend wurde bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden anschließend in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und nochmals bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die Zellen dann in Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausplattiert.

2.2.1.6 Ausplattieren der Zellen

Zum Ausplattieren wurden die Zellen behandelt wie beim Passieren. Nach dem Resuspendieren in Kulturmedium wurden die Zellen jedoch nicht wieder in Zellkulturflaschen zurückgegeben sondern auf 6-well-Platten ausplattiert.

2.2.1.7 Stimulation der Zellen

Um die ausplattierten Zellen stimulieren zu können, wurde das gebrauchte Medium zuerst abgesaugt und anschließend neues Medium vorsichtig vom Rand der Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die Stimulation erfolgte dann durch Hinzupipettieren des jeweiligen Stimulans. Alle Stimulantien wurden bei -30° im Gefrierschrank gelagert.

Tabelle 2: Herstellerverzeichnis und eingesetzte Konzentrationen der Stimulantien

Stimulans	Hersteller/Vertreiber	Eingesetzte Konzentration
IL-1 β , human rekombinant	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)	100ng/ml
IFN- γ , human	Provitro (Berlin)	100ng/ml
TNF- α	CellSystem (Troisdorf)	100ng/ml
LPS	Sigma (St. Louis, USA)	1000ng/ml
Valproic acid sodium salt	Sigma (St. Louis, USA)	0,1M

2.2.2 RNA-Isolation

Nach Ernte mit Trypsin wurden die Zellen 4 Minuten bei 1200 Runden pro Minute zentrifugiert, mit 1 x PBS gewaschen, mit einem die Zellen lysierenden Puffer (RA1- Lysis Buffer) aufgeschlossen und die RNA vom Rest des Zell-Lysates getrennt und gereinigt.

Mit dem NucleoSpin[®] RNA II- Kit (Machery-Nagel, Düren) wurden die Zellen unter stark denaturierenden Bedingungen effizient lysiert, wobei RNAsen umgehend inaktiviert wurden. Dies ermöglichte eine Isolation intakter RNA. Die Isolation wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser abgelöst und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3 Messung des RNA-Gehaltes

Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260/ 280 nm die Absorption mittels Photometer gemessen. In die RT-PCR wurden dann 2 µg RNA eingesetzt.

2.2.4 RT-PCR (reverse transcriptase- PCR)

Die RT-PCR dient der Umschreibung von RNA in cDNA durch ein Enzym namens Reverse Transcriptase, welches namensgebend ist.

Reaktionsschritte:

In die RT-PCR wurden die zuvor mittels Photometer ermittelten 2 µg RNA eingesetzt.

1. Reaktionsansatz:

- Total RNA 2 µg
- Primer 1 µl
- DEPC- treated Water zu 12 µl auffüllen

Reaktionsgemisch gut mixen.

Inkubation bei 70°C für 5 min. Abkühlen auf 4°C.

2. Reaktionsansatz:

- Reaction Buffer 4 µl
- dNTP- Mix 2 µl
- Ribonuclease Inhibitor 1 µl

Inkubation bei 37°C für 5 min. Abkühlen auf 4°C.

3. Reaktionsansatz:

- Reverse Transcriptase 1 µl

Inkubation bei 42°C für 60 min.

Aufheizen auf 70°C für 10 min um Reaktion zu stoppen.

Hergestellte cDNA kann bei 4°C gelagert werden.

2.2.5 Polymerase chain reaktion (PCR)

Ziel des PCR-Verfahrens (PCR, Saiki et al., 1988) ist die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Um dieses Ziel zu erreichen wird zunächst der DNA-Doppelstrang bei 95°C in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Im zweiten Schritt folgt dann die Hybridisierung der Oligonukleotid Primer bei einer Temperatur zwischen 55-62°C je nach Primersequenz (Annealing). Im letzten Schritt synthetisiert die Taq-Polymerase davon ausgehend die komplementären DNA-Stränge (Extension). Durch mehrfache Wiederholung

dieses Reaktionszykluses entsteht eine nahezu exponentielle Amplifikation des spezifischen DNA-Fragmentes, welches dann Amplifikationsprodukt genannt wird.

2.2.5.1 Real Time PCR mit dem LightCycler

Bei der real time PCR wird die Vermehrung des DNA-Fragmentes durch Fluoreszenzmessung direkt während der Amplifikation analysiert. Um eine Fluoreszenzmessung möglich zu machen wird der Reaktionsansatz in Glaskapillaren pipettiert, die zudem durch ein besseres Verhältnis von Volumen zu Oberfläche eine Verkürzung der Zykluszeit bewirken. Der LightCycler ermöglicht diese Automatisierung von „rapid-cycle“-PCR mit gleichzeitiger Fluoreszenzmessung.

Im Anschluß an die PCR wird der Schmelzpunkt des amplifizierten DNA-Fragmentes ermittelt, wobei jedes Amplifikationsprodukt eine charakteristische Schmelztemperatur aufweist. Durch diese Schmelzkurvenanalyse kann das tatsächliche Amplifikationsprodukt von möglichen Primerdimeren unterschieden werden.

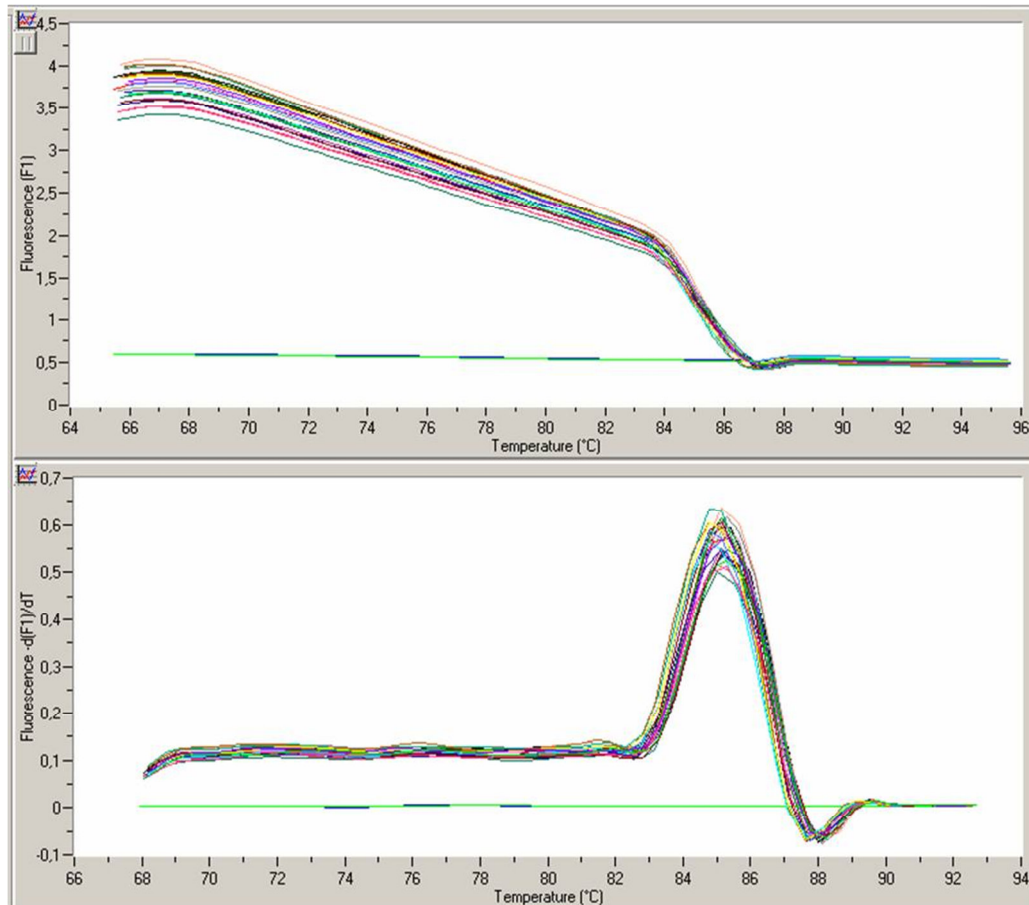


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer durch die real-time PCR erstellten Schmelzkurve

2.2.5.2 Nachweis des Amplifikationsproduktes durch SYBR Green

Der Farbstoff SYBR Green interkaliert nur mit doppelsträngiger DNA, weshalb die Detektion der PCR-Produkte in der Extensionsphase stattfindet. Durch UV-Licht wird der Farbstoff angeregt und sendet Lichtquanten aus, die bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen werden. Da SYBR Green nur beim Interkalieren angeregt werden kann, lässt sich der Schmelzpunkt der PCR-Produkte dadurch ermitteln, dass die Doppelstränge zur Denaturierung gebracht werden. Dies geschieht durch Erhitzen des PCR-Produktes bei 83°C. Sichtbar wird dann ein plötzlicher Abfall der Fluoreszenz.

2.2.5.3 Reaktionsansatz für Real Time PCR

MasterMix		10 µl
H ₂ O		8 µl/ 7 µl
Primer:	sense	1 µl
	antisense	1 µl
cDNA		0 µl/ 1 µl

2.2.5.4 Primer

Alle Primer wurden von OPERON (Ebersberg) geliefert.

Tabelle 3: Verzeichnis der eingesetzten Primer mit Sequenzen, Annealingtemperaturen, Zyklusanzahl und Fragmentgröße

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen	A.-Temp.	Zyklen	Fragment
MHC-I	sense	GCTACTACAACCAGAGCGAGG	60	34	137
	antisense	CCTCGTTCAGGGCGTGTA			
ICAM	sense	CGGAAGGTGTATGAACTGAGCA	60	40	424
	antisense	GTCGCTGGCAGGACAAAGG			
N-CAM	sense	ATGTCCGATTCATAGTCCTGTC	60	40	362
	antisense	CAGCCTCGTCGTTCTTATCC			
CNTN	sense	AACCCACCAAACCACCAGC	60	40	402
	antisense	TTTACTTCCGACTCATTATCCAG			
PBGD	sense	TGGTGAAGCCAGGAGGAA	60	45	
	antisense	GGAAGAAAACAGCCCAAAGA			
NGFR	sense	AAGACCTCATAGCCAGCACG	60	40	405
	antisense	CCCGCAGAGCCGTTGAGAA			

A.-Temp. = Annealing Temperatur (in °C) und *Fragment* = Fragmentgröße (in Basenpaaren)

2.2.5.5 real time PCR-Bedingungen

Tabelle 4: Aufführung der einzelnen real time PCR-Bedingungen mit Dauer und Temperatur

Denaturierung	10 Minuten	95°C	
Amplifikation	10 Sekunden	95°C	x Zyklusanzahl
	10 Sekunden	60°C	
	16 Sekunden	72°C	

2.2.5.6 Auswertung der real time PCR

Die vom LightCycler erstellte Fluoreszenzkurve gliedert sich typischerweise in drei Abschnitte. In der ersten Phase überwiegt das Hintergrundsignal des Systems, worauf sich die Phase anschließt, in der durch Amplifikation ein exponentielles Wachstum der Kurve zu verzeichnen ist. In der letzten Phase kommt es zum Stillstand der Reaktion und damit zur Plateauphase.

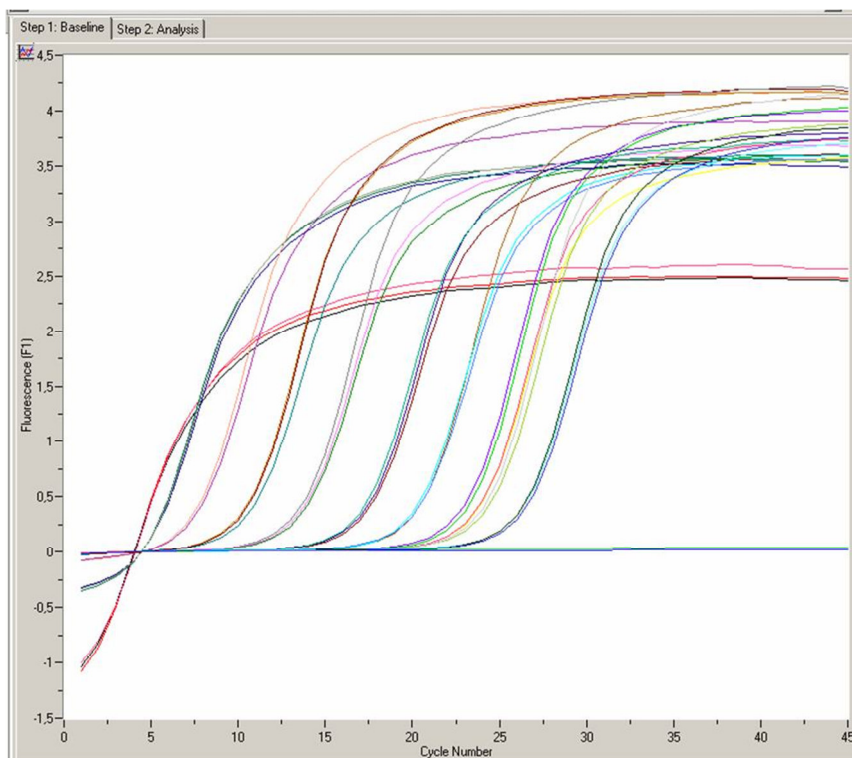


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung einer Verdünnungsreihe ermittelt durch die real time PCR

Die initiale Kopienzahl des untersuchten Gens wird anhand einer Standardkurve berechnet, welche durch Verdünnung der eingesetzten cDNA über mindestens vier Stufen und anschließende Quantifizierung ermittelt wird. Von allen Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die eingesetzte cDNA setzt sich aus allen verwendeten cDNA Proben zusammen und ist damit eine repräsentative Mischprobe.

Für die Quantifizierung wird vom LightCycler für jede Kurve der CT-Wert angezeigt, der definiert ist als die Anzahl von PCR-Zyklen, bei der die Fluoreszenz eine festgesetzte Schwelle überschreitet. Der CT-Wert ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge an cDNA. Trägt man nun den Logarithmus der eingesetzten Menge cDNA gegen die Zyklusanzahl beim CT-Wert auf erhält man die Standardkurve des untersuchten Gens.

Für die einzelnen Zielgene wurden folgende Standardkurven errechnet

CNTN4 $y = -3,23 x + 32,94$

NGFR $y = -3,2 x + 31,24$

MHC-I $y = -3,16 x + 31,5$

N-CAM $y = -3,6 x + 31,44$

ICAM $y = -3,13 x + 32,19$

PBGD $y = -4,05 x + 28,65$

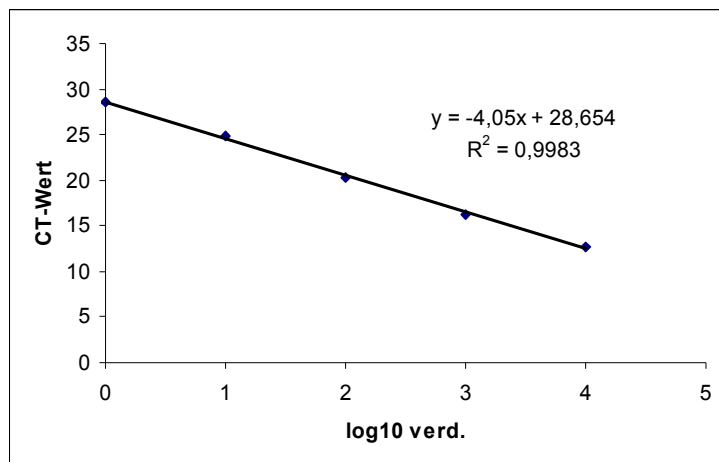


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer Standardkurve nach der oben genannten Formel

Aus der Steigung dieser Standardkurve läßt sich durch folgende Formel die Effizienz (E) der PCR bestimmen: $E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$

Bei einer angenommenen Verdopplung der Kopienanzahl pro PCR-Zyklus sollte die Effizienz einer PCR gleich 2 sein.

Diese Effizienzbestimmung wurde für jedes Zielgen, aber auch für das Referenzgen PBGD, durchgeführt.

Folgende Effizienzen wurden für die einzelnen Zielgene ermittelt

Tabelle 5: Effizienzen der einzelnen Primer

CNTN 4	2,14108132
NGFR	2,04423149
MHC-I	2,05909454
N-CAM	1,91271592
ICAM	2,0858583
PBGD	1,76568643

Mithilfe der Effizienzen kann durch folgende Formel die Ratio berechnet werden:

Tabelle 6: Berechnungratio der real time PCR Ergebnisse über die Effizienzen

$$\text{Ratio} = \frac{(E \text{ Zielgen})^{\Delta \text{CT Zielgen (Kontrolle - Behandlung)}}}{(E \text{ Referenzgen})^{\Delta \text{CT Referenzgen (Kontrolle - Behandlung)}}$$

Diese Ratio drückt also die Veränderung des Zielgens nach Behandlung in Abhängigkeit der Veränderung des Referenzgens nach Behandlung aus. Alle in dem Ergebnisteil vorkommenden PCR-Ergebnisse beziehen sich auf dieses Ratio.

2.2.6 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Durch die Siebstruktur der Agarose wandern dabei größere DNA-Fragmente langsamer als kleinere. Eine effiziente Auftrennung der Fragmente wurde durch eine Agarosekonzentration von 1 % erreicht. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen wurden die Gele in eine Ethidiumbromidlösung eingelegt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann dann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Um die in der PCR gewonnenen DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und um die Qualität der PCR zu überprüfen wurden analytische Agarosegele angefertigt. Hierzu wurden 0,9 g Agarosepulver abgewogen und mit 90 ml TAE aufgeschüttet, in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Je nach Anzahl der zu untersuchenden Proben wurde ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit den gefärbten DNA-Proben befüllt. Die Färbung der DNA-Proben erfolgte mit 5 µl DNA Loading Buffer. Nun wurde die Gelkammer an eine Spannungsquelle angeschlossen und bei 150 Volt 60 Minuten laufen gelassen.

Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in eine Ethidiumbromidlösung gelegt und dann weitere 10 Minuten in einer TAE-Lösung gewaschen. Nach der Anfärbung der DNA wurde diese in einer Geldokumentationskammer unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Es handelt sich bei der Durchflusszytometrie um die Messung zellulärer Eigenschaften während der Bewegung in einem Flüssigkeitsstrom, der fest installierte Detektoren passiert. Das Anwendungsspektrum reicht von der Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis zu intrazellulären Stoffwechselvorgängen.

Die zu untersuchenden Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung in einem Hüllstrom aneinandergereiht und durch einen für die Messung geeigneten gebündelten Laserstrahl geleitet. Bei der Passage des Lasers werden die Elektronen angeregt und auf ein höheres Energieniveau gebracht, anschließend fallen sie wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück, wobei die Energie im Sinne einer emittierten Photonenkonzentration freigegeben wird. Diese Photonenenergie wird von Photodetektoren des Durchflusszytometers registriert. Bei der Registrierung der Beugung und Streuung des Lichtes lässt sich die Zellgröße und Granularität erkennen. Durch die Beugung des Lichtes entsteht „Vorwärtsstreulicht“ (FSC), welches mit der Zellgröße korreliert und durch die Brechung des Lichtes entsteht „Seitwärtsstreulicht“ (SSC), welches wiederum mit der Zellgranularität korreliert.

In diesem Fall wurde das FACSCalibur (BD Biosciences) verwendet, in welchem ein Argonlaser (488 nm) mit einer roten Laserdiode (633 nm) eingebaut ist.

2.2.7.1 Zellaufbereitung

Die in der Zellkultur mit Trypsin geernteten Zellen wurden in 96-well-Platten pipettiert, bei 1200 U/min 4 Minuten zentrifugiert, Überstand abgeschüttet und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, Überstand abgeschüttet und resuspendiert. Darauf folgte die Einwirkung mit dem ersten Antikörper, welcher im Verhältnis 1:100 auf die Wells verteilt wurde und dann bei 4°C 30 Minuten inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die nächste Waschprozedur mit FACS-Puffer wie oben beschrieben. Danach wurde der zweite, nun fluoreszenzmarkierte, Antikörper im Verhältnis 1:75 auf die Zellen gegeben und ebenfalls 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte wieder eine Waschung mit FACS-Puffer und anschließend die Aufnahme des Zellgemisches in 300 µl FACS-Puffer.

Die Zellen wurden nun am FACSCalibur™ gemessen.

2.2.7.2 Antikörper

Tabelle 7: Antikörperverzeichnis mit Spezifität, Isolation und Hersteller

Antikörper	aus	anti-	Hersteller
Isotyp-Kontrolle	rabbit	mouse	Dako (Glostrup, Dänemark)
HLA-ABC (MHC-I)	mouse	human	Dako (Glostrup, Dänemark)
CD 56 (NCAM)	mouse	human	Dako (Glostrup, Dänemark)
NGFR	mouse	human	BD-Pharmingen (Heidelberg)
Contactin-4	goat	human	R&D Systems (Minneapolis, USA)
CD 54 (ICAM)	mouse	human	Dako (Glostrup, Dänemark)
2nd Antibody (FITC-markiert)	rabbit	mouse	Dako (Glostrup, Dänemark)
2nd Antibody (FITC-markiert)	rabbit	goat	Dako (Glostrup, Dänemark)

2.2.7.3 Analyse und Darstellung

Zur Darstellung und Auswertung der gewonnenen Daten stehen bei der Durchflusszytometrie grundsätzlich zwei Verfahren zur Verfügung. Zum einen das Streudiagramm, in welchem zwei Parameter, meist Zellgröße und Granularität, gegeneinander aufgetragen werden. Jede Zelle erhält aufgrund dieser beiden Merkmale einen Punkt in der Darstellung. Mit diesem Verfahren lassen sich beispielsweise die einzelnen Zellpopulationen im Vollblut sehr gut darstellen. Das zweite Verfahren ist die Darstellung im Histogramm. Dabei wird die Häufigkeitsverteilung in einer Probe dargestellt. Auf der Y-Achse wird die Häufigkeit aufgetragen, welche von der Zahl der gemessenen Zellen abhängt. Um die Werte der einzelnen Proben möglichst vergleichbar zu machen sollten also immer gleich viele Zellen gemessen werden. Auf der X-Achse wird hingegen die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen. Zur weiteren Auswertung kann nun entweder der Mittelwert (mean fluorescence) bestimmt werden oder der Prozentsatz der Zellen ermittelt werden, die einen bestimmten Wert übersteigen. Dies kann durch Setzen von Grenzwerten (Markern) umgesetzt werden. Um nur eine bestimmte Gruppe von Ereignissen messen zu können kann eine sogenannte „region of interest“ (ROI)-Technik verwendet werden.

2.3 Verwendete Softwares

Zur Auswertung der verschiedenen Methoden wurden folgende Softwareprogramme eingesetzt:

Office Word 2003	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Office Excel 2003	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Graph Pad Prism 4.02	STATCON B. Schäfer, Witzenhausen
Win MDI 2.8	Joseph Trotter, USA
CellQuest pro®	Becton Dickinson, Heidelberg
LightCycler Software 3.5	Roche Molecular Biochemical, Basel, Schweiz

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism4 Software. Dazu wurde ein two-way-ANOVA-Test durchgeführt. Eine post-hoc-Analyse erfolgte mit dem Bonferroni's *multiple comparison* Test. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ gewertet. Das Konfidenzintervall lag bei 95 %.

3. Ergebnisse

3.1 MHC-I

IFN γ zeigt im Vergleich mit anderen proinflammatorischen Zytokinen sowie Valproat einen deutlich stärkeren Effekt auf die Expression von MHC-I

Bei den mit IFN γ stimulierten Zelllinien zeigte sich bei den beiden Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y in der FACS-Analyse nach 12h, 24h und 48 h ein statistisch signifikanter positiver Effekt auf die Expression von MHC-I ($p < 0,001$; Abb. 5). Es zeigte sich zudem ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden getesteten Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und SK-N-SH zugunsten der Zelllinie SK-N-SH, auf welcher ein deutlich stärkerer Effekt erzielt werden konnte ($p < 0,001$; Abb. 5). Im Gegensatz dazu konnte auf der Zelllinie HEK-293 keine signifikante Expressionsänderung nachgewiesen werden (Abb. 5).

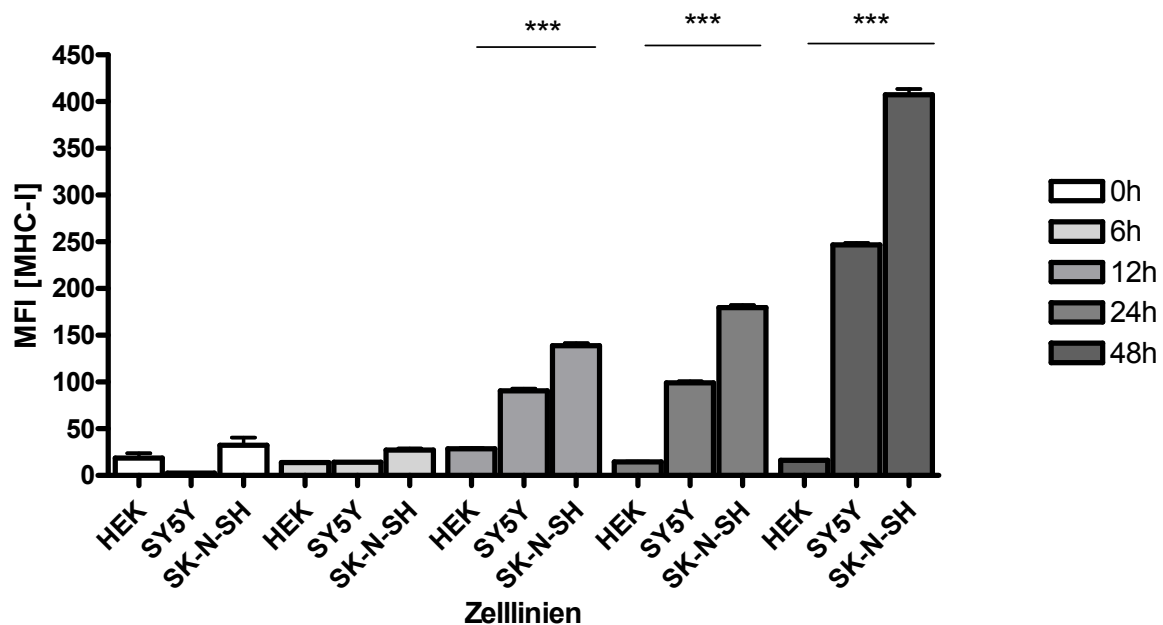


Abbildung 5: Oberflächenexpression MHC-I der Zelllinien HEK-293, SH-SY5Y und SK-N-SH nach Stimulation mit IFN γ

Zeigt den Anstieg der Expression des Adhäsionsmoleküls MHC-I der einzelnen Zelllinien nach Stimulation mit IFN γ in Abhängigkeit von den verschiedenen Inkubationszeiten auf Proteinebene. Deutlich wird dabei der größere Effekt auf den Neuroblastomzelllinien im Vergleich zu HEK-293. Zudem steigt die Kurve in Abhängigkeit von der Inkubationszeit deutlich an. Der Effekt auf die Zelllinie SK-N-SH zeigt sich in allen Versuchen stärker als der auf die Zelllinie SY5Y. *** $p < 0,001$

Auf beiden Neuroblastomzelllinien korrelierte die Inkubationsdauer positiv mit dem Expressionslevel (SK-N-SH Korrelationskoeffizient $r = 0,968$; $p = 0,0082$; Abb.5 und SH-SY5Y: Korrelationskoeffizient $r = 0,941$; $p = 0,015$; Abb.5).

Die Ergebnisse auf Proteinebene werden durch die Ergebnisse auf RNA-Ebene gestützt. Es zeigt sich auch in diesen Versuchen ein signifikanter Anstieg der MHC-I-mRNA nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ in beiden Neuroblastomzelllinien ($p < 0,0001$; Abb. 6). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Neuroblastomzelllinien zugunsten der Zelllinie SK-N-SH (Abb. 6). Weiterhin konnte erneut eine positive Korrelation zwischen der Inkubationsdauer und dem Expressionslevel nachgewiesen werden (Abb. 6).

Auf der Zelllinie HEK-293 konnte nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ kein Expressionsanstieg der MHC-I-mRNA gezeigt werden ($p > 0,05$; Abb. 6).

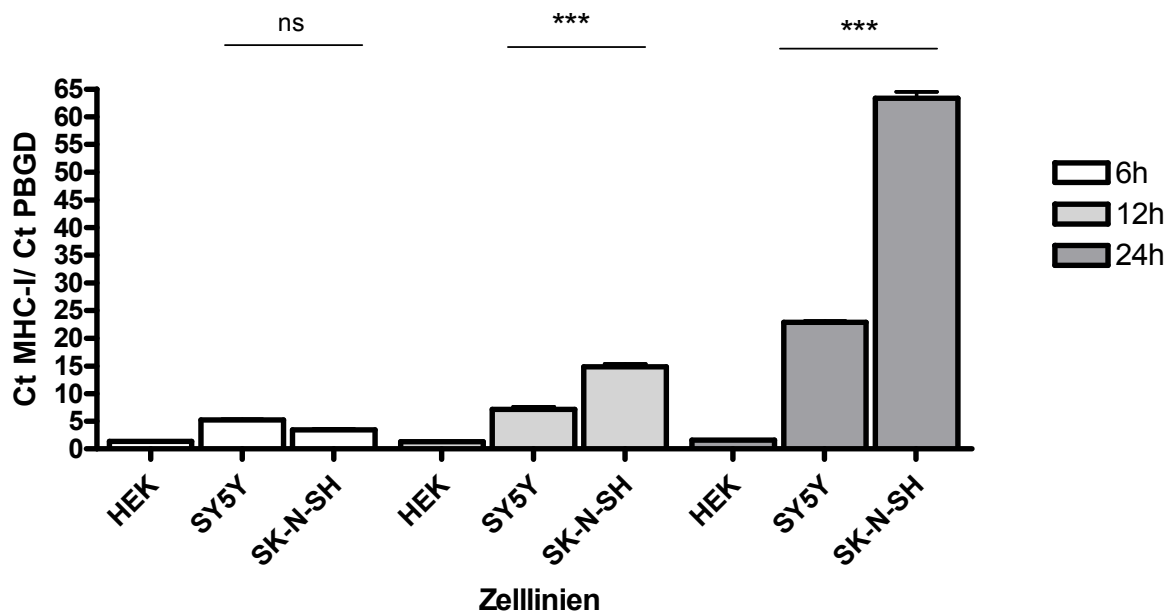


Abbildung 6: Gegen PBGD normalisiertes MHC-I-mRNA-Expressionsratio nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$
Zeigt den Stimulationseffekt von $\text{IFN}\gamma$ auf die Expression des Adhäsionsmoleküls MHC-I der Zelllinien SK-N-SH, SH-SY5Y und HEK-293 nach verschiedenen Inkubationszeiten auf RNA-Ebene. *** $p < 0,001$

Auf Proteinebene lässt sich in einer direkten Vergleichsgrafik durch Stimulation mit IFN γ nach allen Inkubationszeiten der stärkste Expressionanstieg des MHC-I-Moleküls nachweisen ($p < 0,0001$; Abb. 7). TNF α induziert nach 48 Stunden und Valproat nach 12 Stunden Inkubationsdauer einen signifikanten Anstieg der MHC-I-Expression ($p < 0,0001$ und $p < 0,001$; Abb. 7). Durch Stimulation mit IL-1 β und LPS konnte kein Expressionanstieg nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Abb.7).

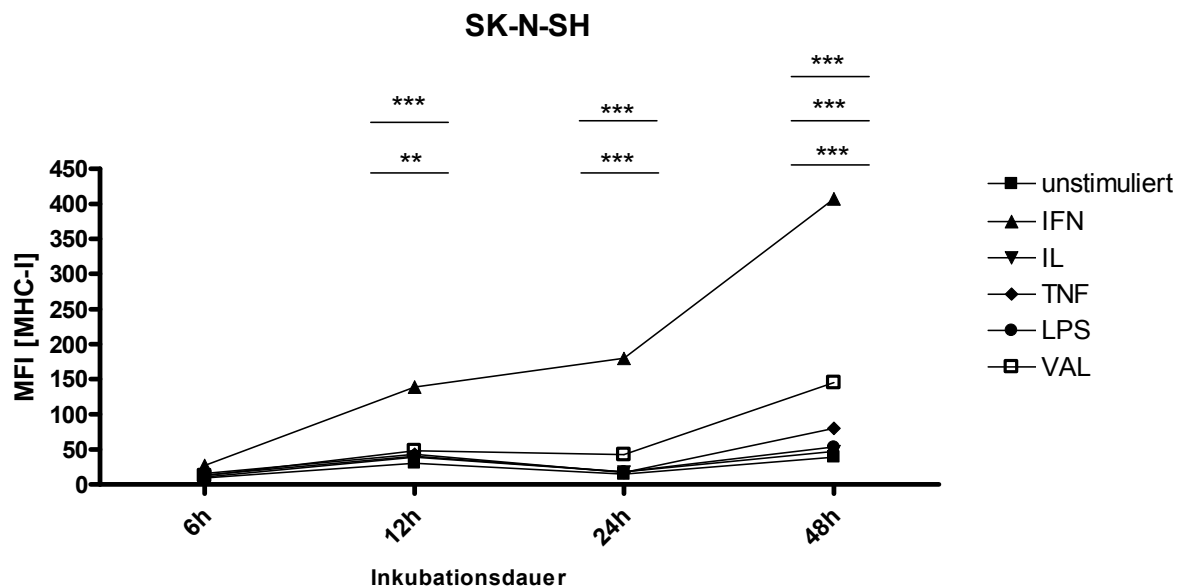


Abbildung 7: MHC-I-Expression der Zelllinie SK-N-SH +/- Stimulation mit verschiedenen Zytokinen nach unterschiedlicher Inkubationsdauer

Diese Abbildung zeigt den Vergleich des Effektes der verschiedenen Zytokine auf die Expression von MHC-I der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH nach unterschiedlicher Inkubationsdauer in der FACS-Analyse. *** $p < 0,001$

Auf RNA-Ebene kann ein signifikanter Expressionsanstieg der MHC-I-mRNA durch IFN γ -Stimulation auf Neuroblastomzelllinien nach allen Inkubationszeiten bestätigt werden ($p < 0,0001$; Abb. 8). Durch Stimulation mit IL-1 β , TNF α , LPS sowie dem Histondeacetylasehemmer Valproat kann kein Stimulationseffekt auf die Expression von MHC-I-mRNA erzielt werden ($p > 0,05$; Abb. 8).

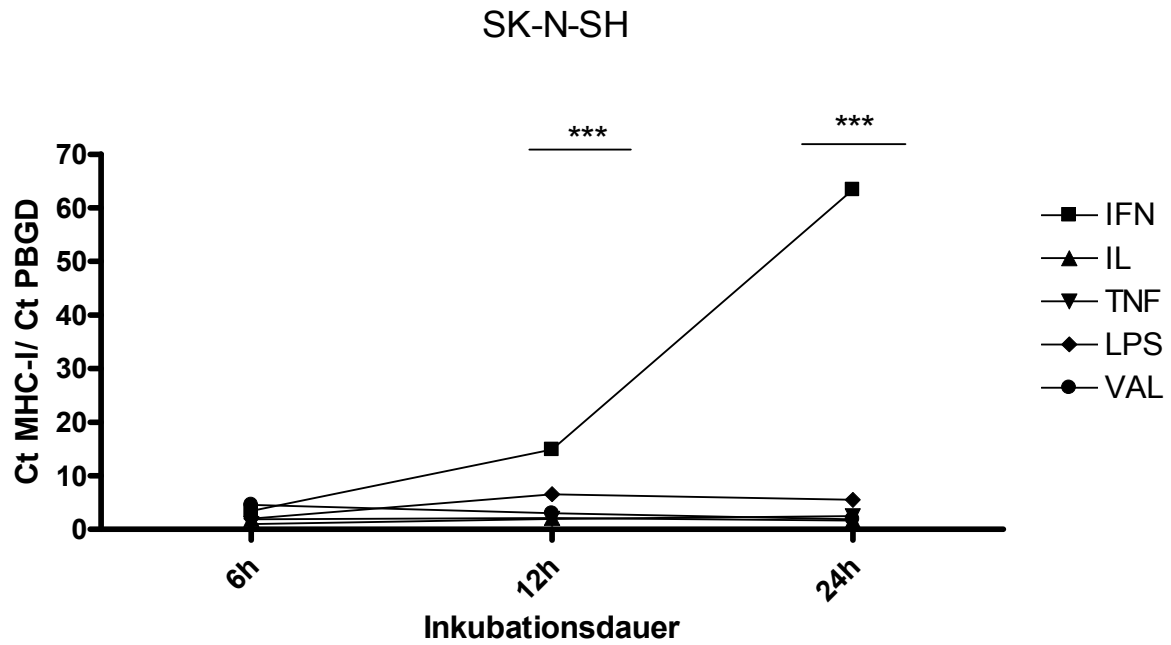


Abbildung 8: Gegen PBGD normalisiertes MHC-I-mRNA-Expressionslevel der Zelllinie SK-N-SH nach Stimulation mit aufgeführten Zytokinen

Diese Abbildung zeigt den direkten Vergleich der mRNA-Expression von MHC-I der Zelllinie SK-N-SH nach Stimulation mit den einzelnen Zytokinen untersucht mit der real time PCR. *** $p < 0,001$

3.2 ICAM-1 (CD 54)

IFN γ führt zu einem Expressionsanstieg des Oberflächenproteins ICAM-1 (CD 54) auf Neuroblastomzelllinien

IFN γ führt zu einer Expressionssteigerung von ICAM-1 auf beiden Neuroblastomzelllinien, nicht jedoch auf der Kontroll-Zelllinie HEK-293 (SH-SY5Y und SKN-SH p jeweils < 0.001 ; HEK-293 p $> 0,05$; Abb. 9). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Neuroblastomzelllinien.

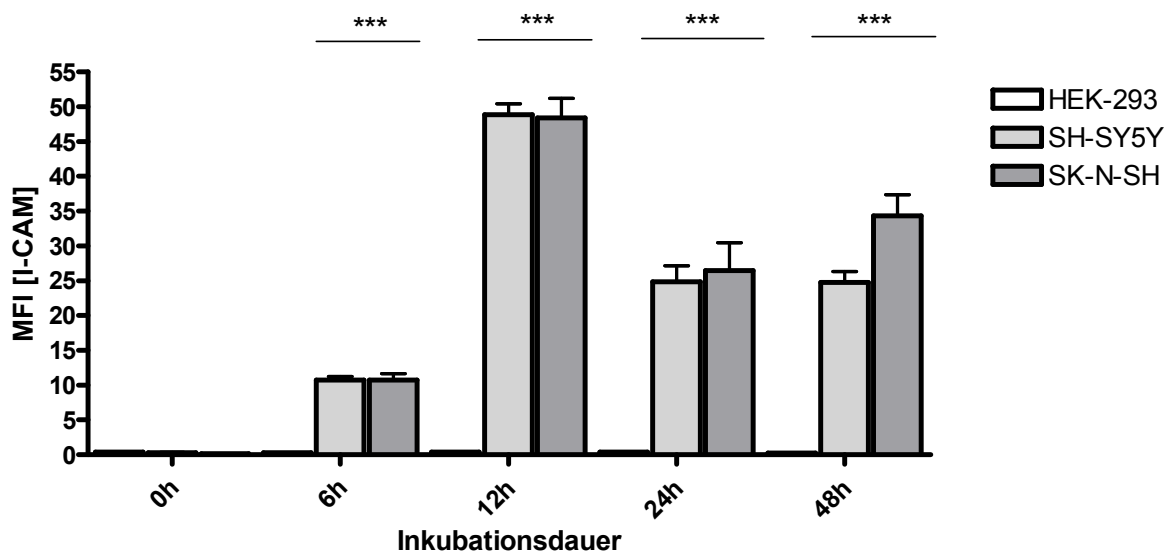


Abbildung 9: ICAM-1-Expression nach IFN γ -Stimulation

Zeigt die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nach Stimulation mit dem Zytokin IFN γ in Abhängigkeit von den Inkubationszeiten auf drei verschiedenen Zelllinien. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. *** p $< 0,001$

Im Zeitverlauf zeigte sich ein Maximum des Expressionsanstiegs nach 12h auf beiden Neuroblastomzelllinien (p $< 0,001$; Abb. 9). Danach fällt die Expression ab, bleibt aber im Vergleich zum basalen Level deutlich erhöht.

Bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y kann auf Proteinebene in einer direkten Vergleichsgraphik der deutlichste Stimulationseffekt auf die Expression des ICAM-1-Moleküls durch IFN γ gezeigt werden (p $< 0,001$; Abb. 10). Durch Stimulation mit TNF α lässt sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Expressionsanstieg des ICAM-1-Moleküls induzieren (p $< 0,001$; Abb. 10). IL-1 β , LPS und VPA zeigen keinen signifikanten Effekt auf die Expression von ICAM-1 (p $> 0,05$; Abb. 10).

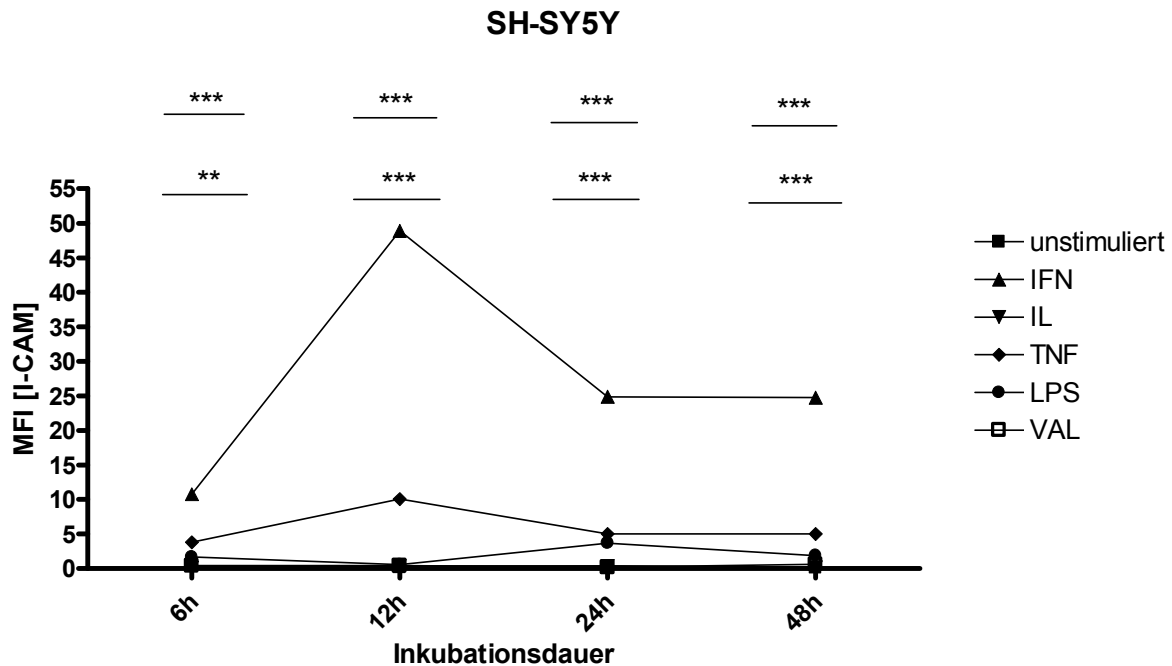


Abbildung 10: ICAM-1-Expression +/- Stimulation der Zelllinie SH-SY5Y

Diese Abbildung zeigt den Vergleich zwischen den verschiedenen Zytokinen Interleukin-1 β , TNF α , IFN γ , LPS und Valproat in ihrer Wirkung auf das Oberflächenprotein ICAM-1 nach verschiedener Inkubationsdauer der Zelllinie SY5Y in der FACS-Analyse. *** $p < 0,001$

Durch die Stimulation mit IFN γ kann auf der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH der deutlichste Stimulationseffekt nachgewiesen werden, nach Stimulation mit LPS kann nach 12 Stunden Inkubationsdauer ein signifikanter Expressionsanstieg gezeigt werden (IFN γ $p < 0,001$; LPS 12h $p < 0,01$, 24h und 48h $p < 0,001$; Abb. 11). Nach Stimulation mit TNF α , IL-1 β und VPA konnte kein signifikanter Expressionsanstieg nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Abb. 11).

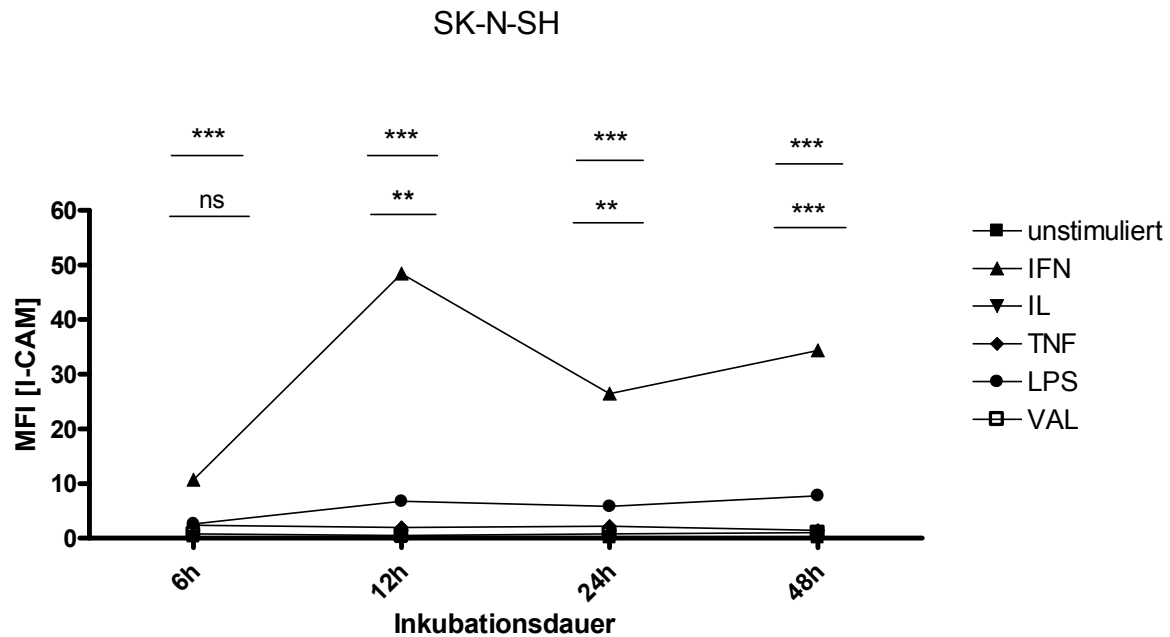


Abbildung 11: ICAM-1-Expressionsvergleich nach Stimulation SK-N-SH

Zeigt den Vergleich zwischen unstimulierten und mit verschiedenen Zytokinen stimulierten SK-N-SH-Zellen bezüglich ihres Expressionsverhaltens von ICAM-1 (CD 54) gemessen mit der Durchflusszytometrie. *** $p < 0,001$

Der schon auf Protein-Ebene gezeigte Expressionsanstieg des ICAM-1-Moleküls (CD 54) nach Stimulation mit IFN γ lässt sich auf RNA-Ebene ebenfalls nachweisen ($p < 0,001$; Abb. 12). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Neuroblastomzelllinien zugunsten der Zelllinie SK-N-SH, auf welcher ein deutlich stärkerer Effekt erzielt werden konnte ($p < 0,001$; Abb. 12). Auf der Zelllinie HEK-293 konnte kein Expressionsanstieg nach Stimulation detektiert werden ($p > 0,05$; Abb. 12).

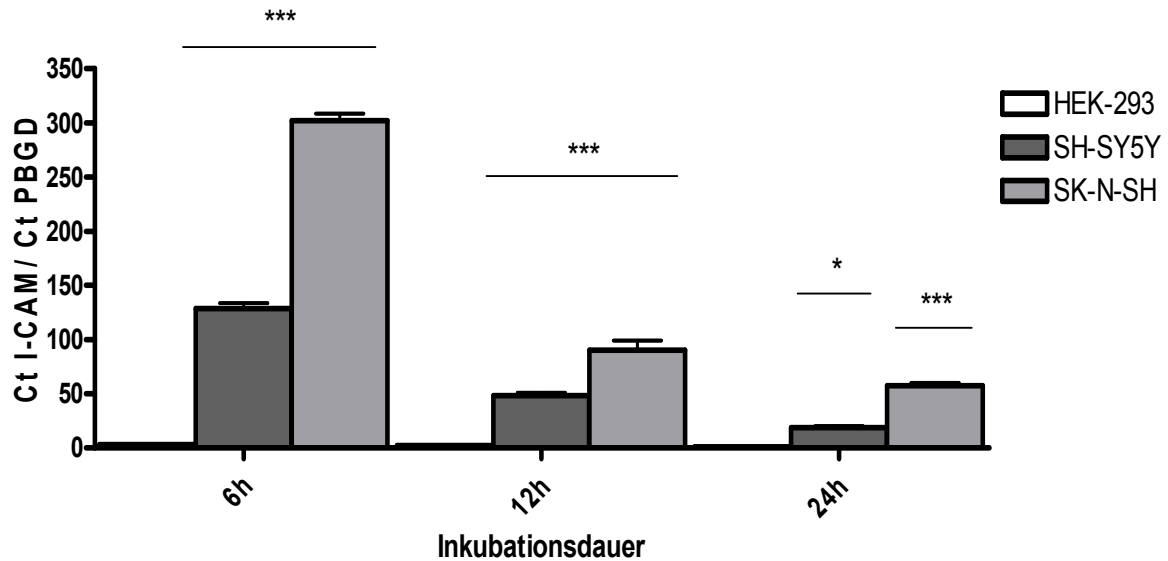


Abbildung 12: Zelllinienvergleich des gegen PBGD-normalisierten mRNAExpressionslevels von ICAM-1 nach IFN γ -Stimulation

Diese Abbildung zeigt den Expressionsanstieg des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nach Stimulation mit dem Zytokin IFN γ nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen mit der real time-PCR. Es zeigt sich ein deutlicher Effekt auf die Neuroblastomzelllinien SY5Y und SK-N-SH im Vergleich zur Negativ-Kontrolle HEK-293. *** $p < 0,001$

In einer Vergleichsgraphik zeigt sich auf RNA-Ebene entsprechend den Ergebnissen auf Protein-Ebene der deutlichste Expressionsanstieg der ICAM-1-mRNA nach IFN γ -Stimulation ($p < 0,001$; Abb 13a). Ein signifikanter Expressionsanstieg kann auch nach Stimulation mit LPS und TNF α gezeigt werden, nach LPS-Stimulation jedoch nur auf der Zelllinie SK-N-SH ($p > 0,01$; Abb 13b)

Der Stimulationseffekt erreicht in beiden Neuroblastomzelllinien ein Maximum nach 6h und fällt dann langsam wieder ab.

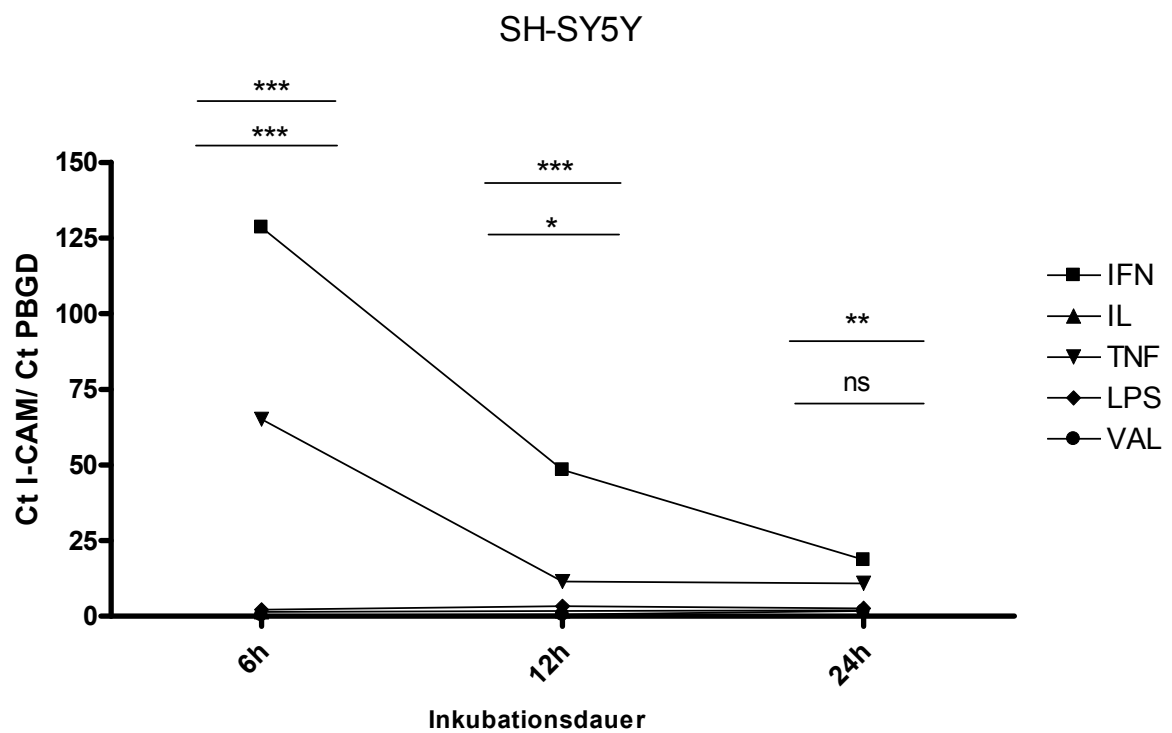
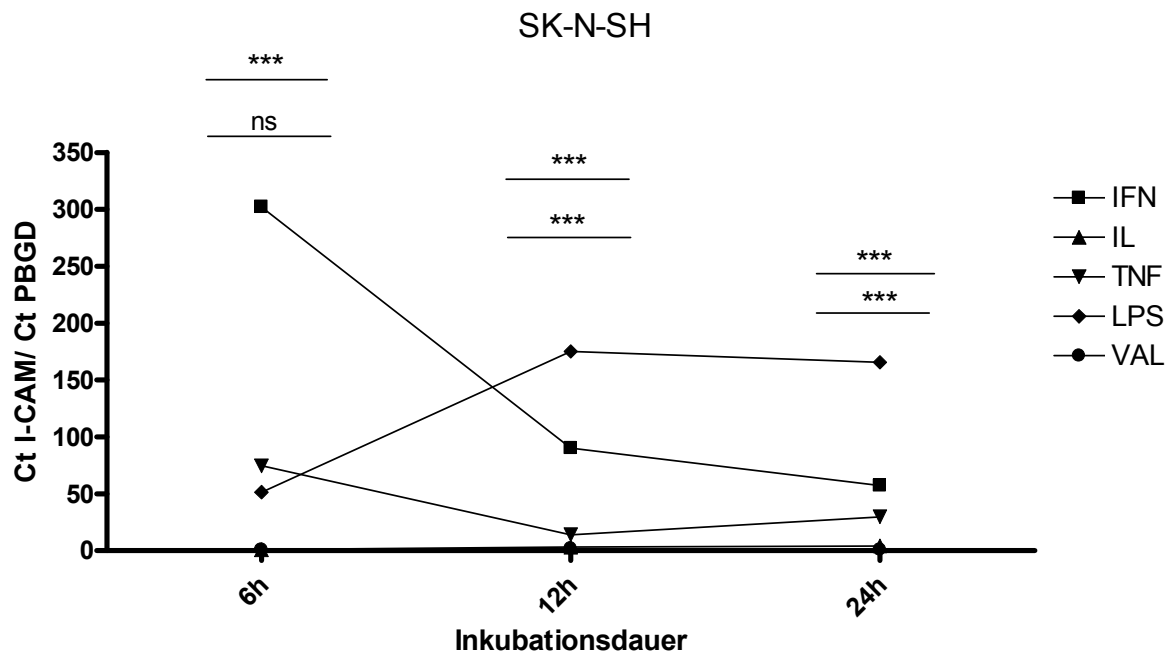


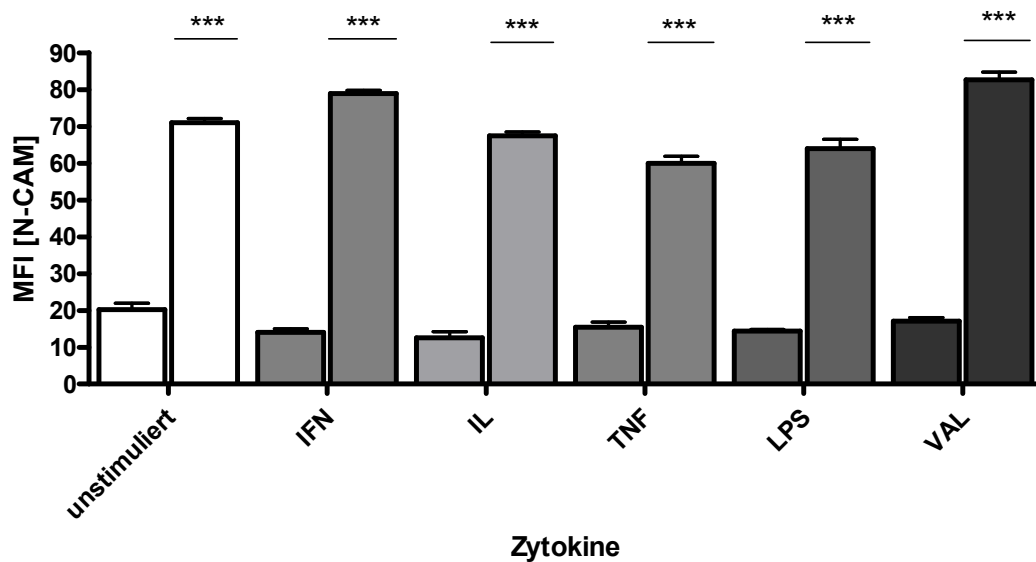
Abbildung 13: Gegen PBGD normalisiertes ICAM-1-mRNA-Expressionlevel nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Zelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y

Diese Abbildungen zeigen die PCR-Ergebnisse der einzelnen Zelllinien nach Stimulation mit den aufgeführten Zytokinen bezüglich der ICAM-1 Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten. *** p < 0,001

3.3 N-CAM (CD 56)

Expression des Oberflächenproteins N-CAM (CD 56) unverändert nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen sowie Valproinsäure auf Neuroblastomzelllinien

Nach Stimulation der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH zeigte sich im Vergleich zur Negativ-Kontrolle HEK-293 auf Protein-Ebene kein eindeutiger Effekt eines einzelnen Zytokins oder des Histondeacetylasehemmers Valproat auf die Expression des Oberflächenmoleküls N-CAM ($p > 0,05$; Abb. 14).



Abbildungen 14: N-CAM-Expression +/- Stimulation, SK-N-SH und HEK-293 im Vergleich

Diese Abbildungen zeigen exemplarisch das Expressionsniveau des Oberflächenmoleküls N-CAM (CD 56) nach einer Inkubationsdauer von 12h auf den Zelllinien SK-N-SH und HEK-293 vor und nach Stimulation mit den aufgeführten Zytokinen in unterschiedlicher Darstellungsform. *** $p < 0,001$

Auf Protein-Ebene kommt es bei keinem Stimulans zu einem signifikanten Anstieg der Expression des N-CAM-Moleküls auf der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH ($p > 0,05$; Abb. 15)

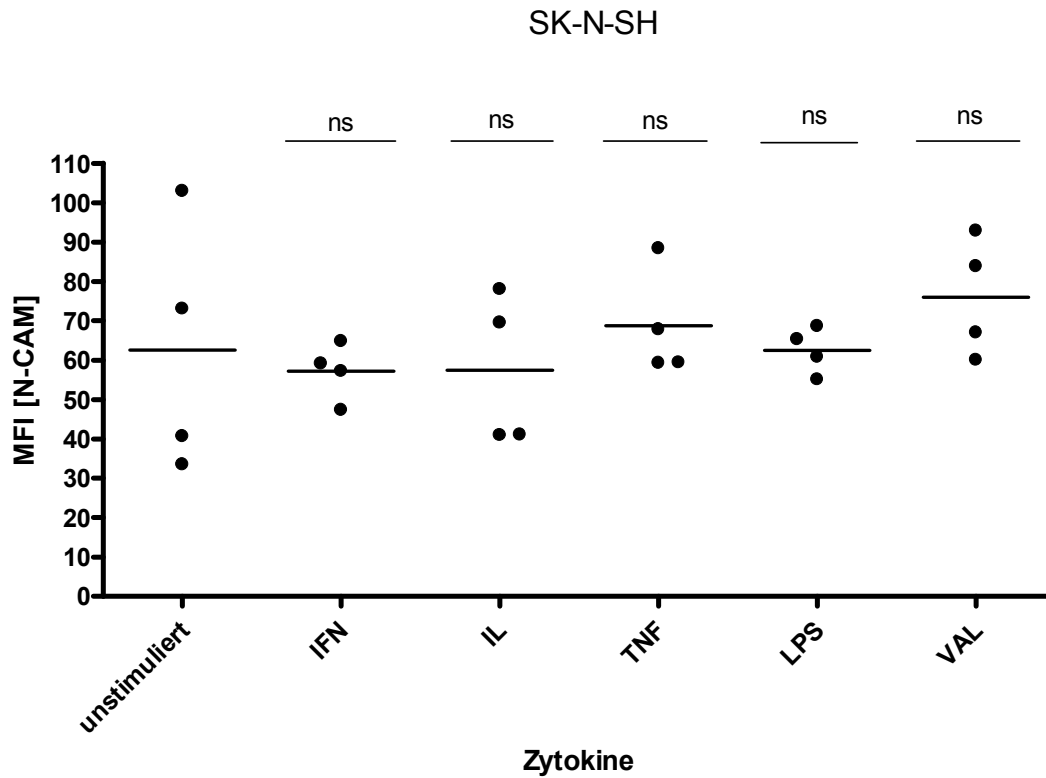
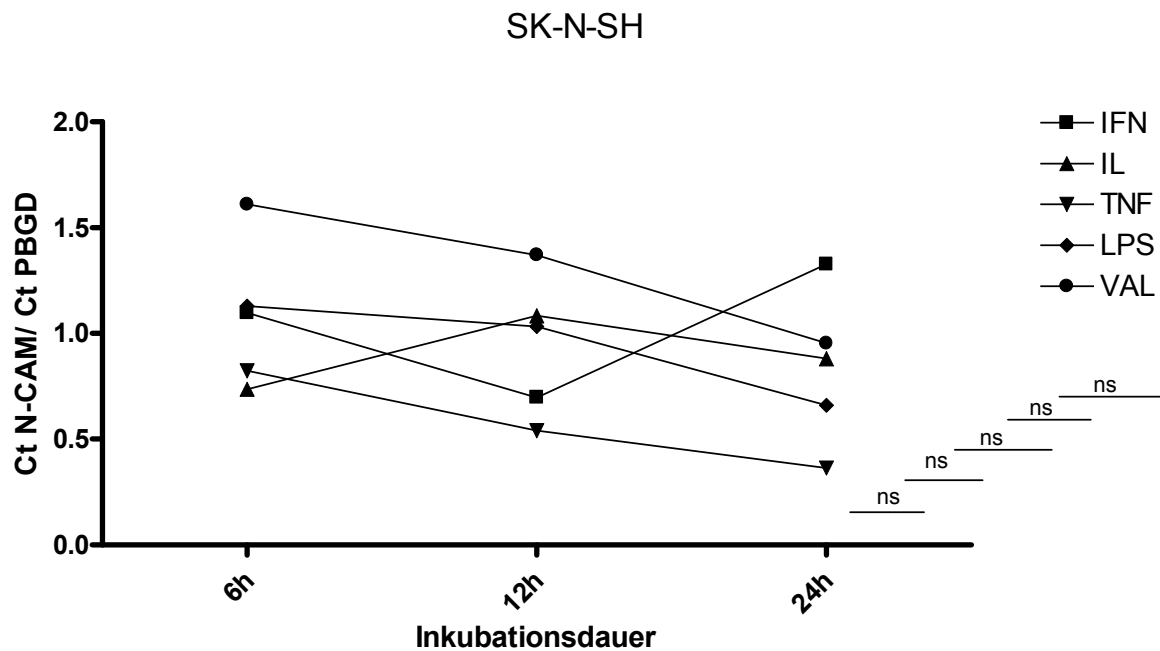


Abbildung15: N-CAM-Expression +/- Stimulation der Zelllinie SK-N-SH

Diese Abbildung zeigt den Effekt aller Zytokine auf das Adhäsionsmolekül N-CAM (CD 56) auf der Zelllinie SK-N-SH in der FACS-Analyse. *** $p < 0,001$

Auch auf RNA-Ebene kann durch die Stimulation mit den aufgeführten Zytokinen kein Expressionsanstieg des N-CAM-Moleküls auf den Neuroblastomzelllinien detektiert werden ($p > 0,05$; Abb. 16)



Abbildungen 16: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-Expressionslevel von N-CAM nach Stimulation der Zelllinie SK-N-SH

Die obigen Abbildungen zeigen den Effekt von SK-N-SH-Zellen nach Stimulation mit den oben angegebenen Zytokinen IL-1 β , TNF α , IFN γ , LPS und Valproat und deren Einfluss auf die Expression des Oberflächenmoleküls N-CAM (CD 56) unter Zuhilfenahme verschiedener Darstellungsformen. *** $p < 0,001$

In einer Vergleichsgraphik auf RNA-Ebene zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Expressionslevel von N-CAM der Zelllinie HEK-293 zu den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und SK-N-SH nach einer exemplarischen Inkubationsdauer von 12 Stunden ($p > 0,05$, Abb. 17).

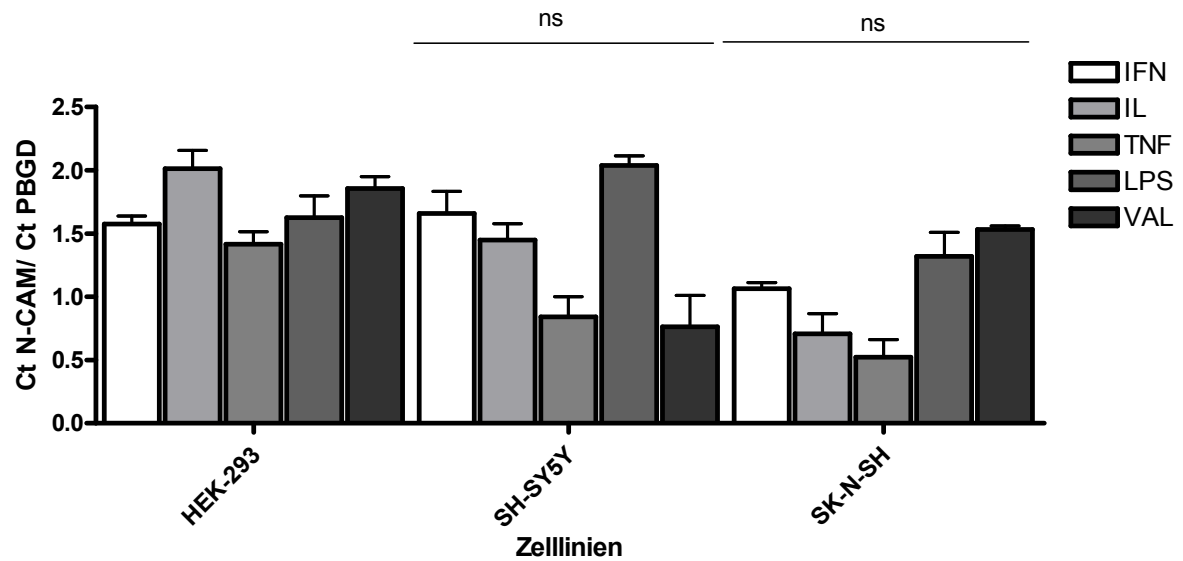


Abbildung 17: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-Expressionsratio von N-CAM nach Stimulation

Diese Abbildungen zeigen den Vergleich der Expression von N-CAM nach Stimulation mit den aufgeführten Zytokinen nach 12 Stunden Inkubationsdauer der Zelllinien HEK-293, SH-SY5Y und SK-N-SH auf RNA-Ebene unter Zuhilfenahme verschiedener Darstellungsformen. *** $p < 0,001$

3.4 NGFR (TrkA)

Der Histondeacetylasehemmer Valproinsäure (Valproat) führt zu einer Hochregulierung der Expression des Oberflächenrezeptors NGFR

Der deutlichste Effekt auf die Expression des Oberflächenrezeptors NGFR der Zelllinie SK-N-SH lässt sich nach Stimulation mit Valproat nachweisen, hier kommt es nach allen Inkubationszeiten zu einem signifikanten Anstieg auf Protein-Ebene ($p < 0,001$; Abb. 18). Auch nach Stimulation mit LPS kommt es nach 6 Stunden und 12 Stunden Inkubationsdauer zu einem signifikanten Anstieg der NGFR-Expression ($p < 0,01$; Abb. 18). Für die anderen Zytokine konnte kein signifikanter Stimulationseffekt nachgewiesen werden.

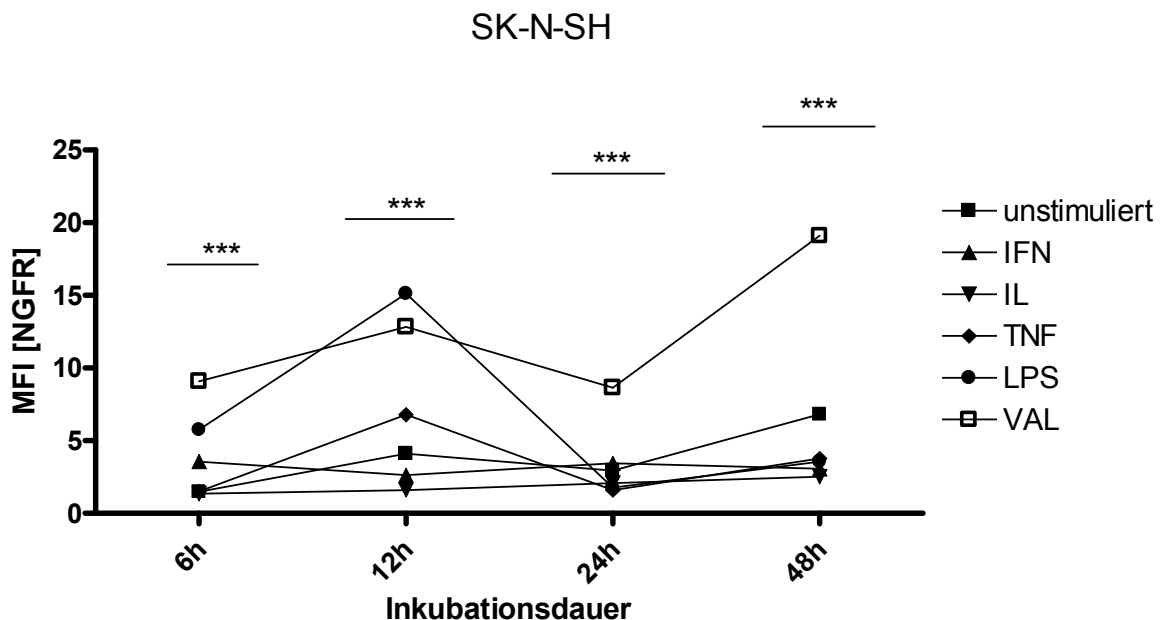


Abbildung 18: NGFR-Expressionslevel +/- Stimulation der Zelllinie SK-N-SH

Diese Abbildung zeigt das Expressionsverhalten von NGFR 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Stimulation mit den Zytokinen IFN γ , IL-1 β , TNF α , LPS und Valproat im Vergleich zu unstimulierten Zellen der Zelllinie SK-N-SH in der FACS-Analyse. *** $p < 0,001$

Auch auf der Zelllinie HEK-293 kommt es nach Stimulation mit Valproat zu einem Anstieg der NGFR-Expression, in einer Vergleichsgraphik ergibt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen dem Expressionslevel der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH und der Zelllinie HEK-293 ($p < 0,001$; Abb. 19). Auch hier konnte kein Stimulationseffekt durch die übrigen Zytokine nachgewiesen werden.

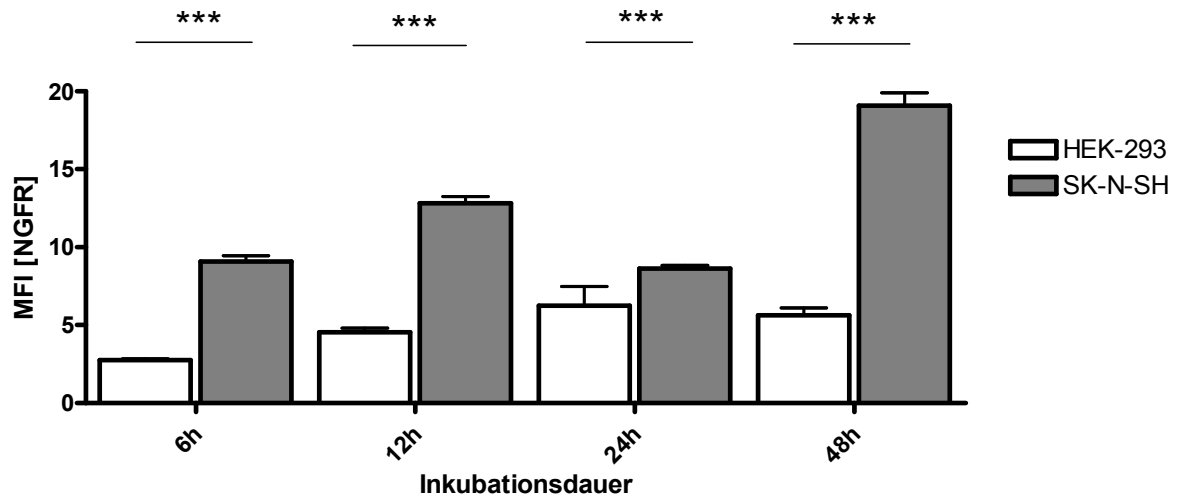
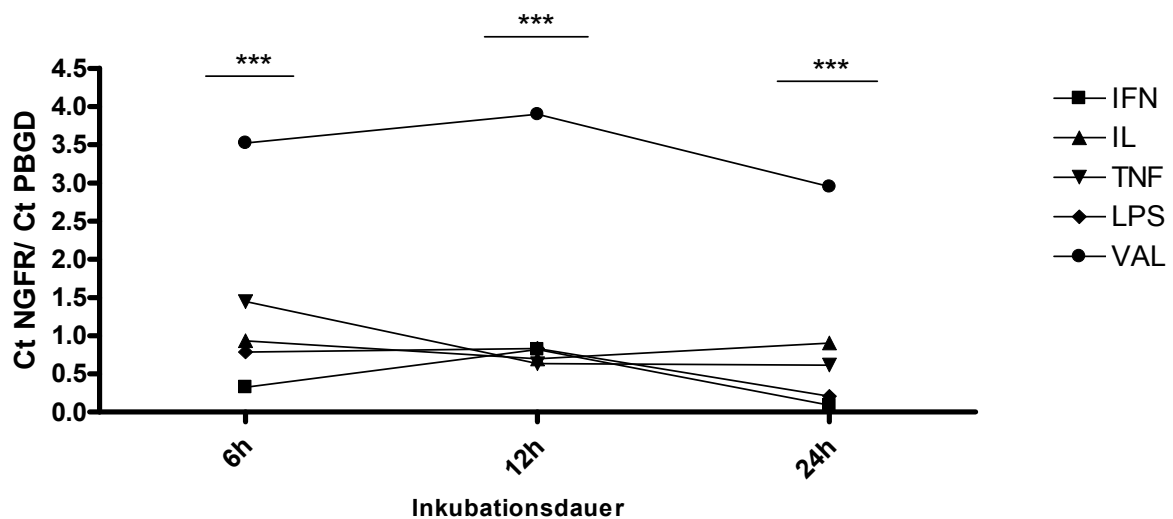


Abbildung 19: NGFR-Expression nach Valproinsäurestimulation

Diese Abbildung zeigt den Vergleich zwischen mit Valproinsäure stimulierten Zellen der Zelllinien HEK-293 und SK-N-SH nach 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden Inkubationsdauer in den FACS-Versuchsreihen. *** $p < 0,001$

Auf RNA-Ebene bestätigen sich die schon auf Protein-Ebene gezeigten Ergebnisse hinsichtlich des positiven Effektes des Valproats auf die Expression des Oberflächenrezeptors NGFR auf beiden Neuroblastomzelllinien ($p < 0,001$; Abb. 20). Durch die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ und LPS konnte kein signifikanter Expressionsanstieg nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Abb. 20).

SH-SY5Y



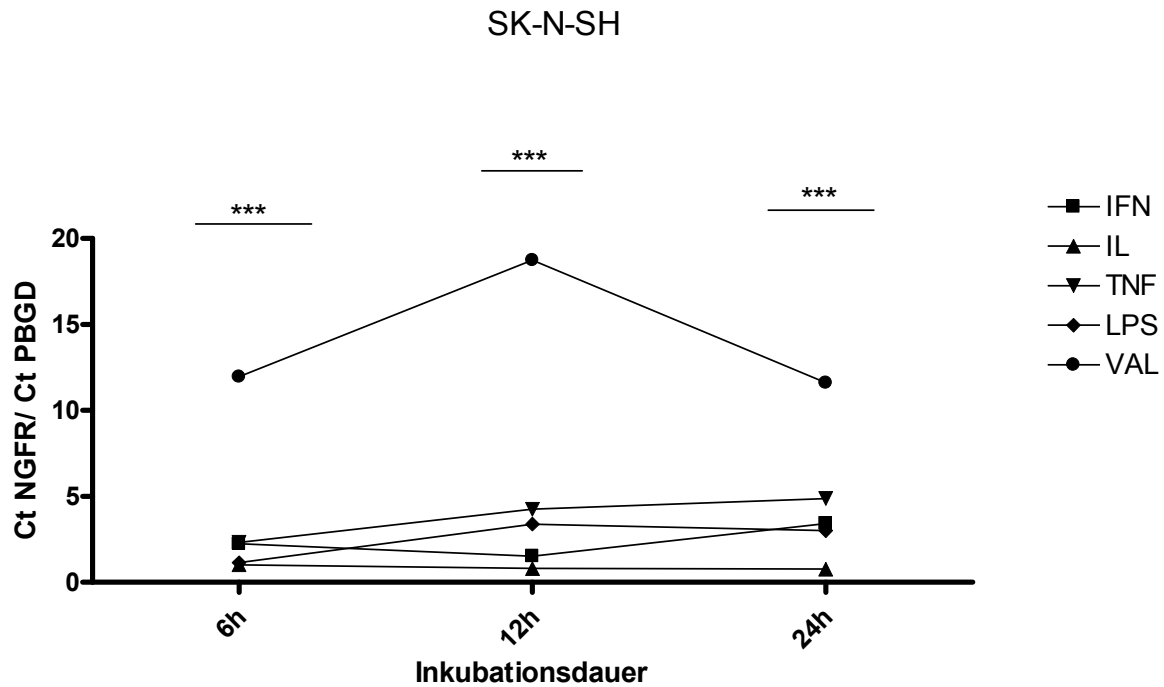


Abbildung 20: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-NGFR-Expressionslevel nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Zelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y

Diese Abbildungen zeigen das mRNA-Expressionsniveau der Zelllinien SK-N-SH sowie SH-SY5Y nach Stimulation mit den aufgeführten Zytokinen nach den auf der x-Achse genannten Inkubationszeiten im Rahmen der PCR-Untersuchungen. *** $p < 0,001$

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden getesteten Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und SK-N-SH zugunsten der Zelllinie SK-N-SH, auf welcher ein deutlich stärkerer Effekt erzielt werden konnte ($p < 0,001$; Abb. 21). Im Gegensatz dazu konnte auf der Zelllinie HEK-293 keine signifikante Expressionsänderung nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Abb. 21).

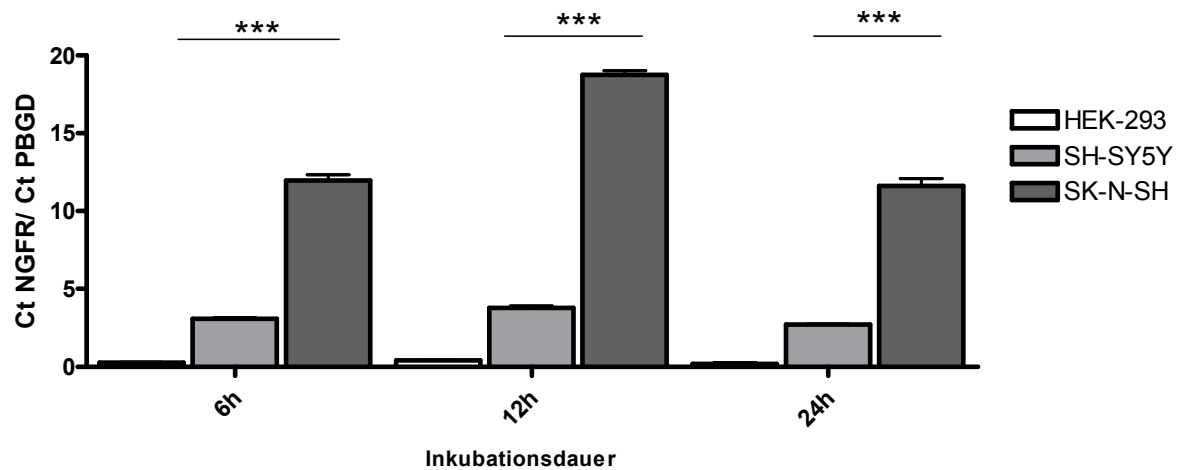


Abbildung 21: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-Expressionsratio von NGFR nach Valproatstimulation

Die Abbildung zeigt den Vergleich aller Zelllinien nach Stimulation mit Valproinsäure abhängig von den verschiedenen Inkubationszeiten ermittelt mit der real time PCR. Es handelt sich bei den Ergebnisse um ein Ratio aus stimulierten und unstimulierten Zellen. *** $p < 0,001$

3.5 CNTN-4 (BIG-2)

Beim dem Adhäsionsmolekül CNTN-4 (BIG-2) zeigt sich nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und dem Histondeacetylasehemmer Valproat kein eindeutiger Effekt auf das Expressionsverhalten.

CNTN-4 ist sowohl auf den Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y als auch auf der Zelllinie HEK-293 in der FACS-Analyse detektierbar.

Durch Stimulation kann jedoch kein signifikanter Expressionsanstieg nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Abb. 22). Diese Ergebnisse zeigen sich auf beiden Neuroblastomzelllinie nach allen Inkubationszeiten ($p > 0,05$; Abb. 22).

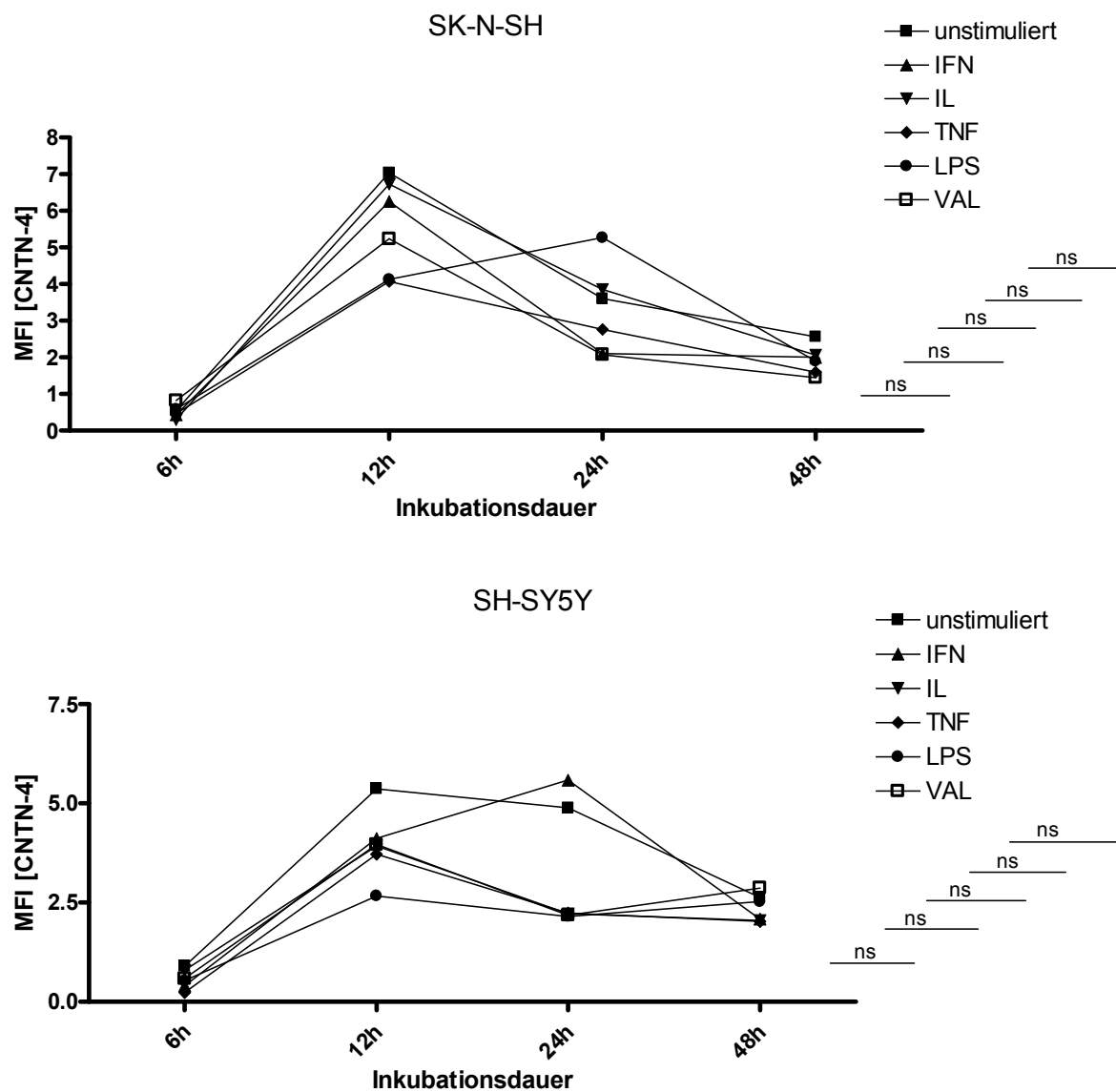


Abbildung 22: CNTN-4-Expressionsniveau +/- Stimulation, SK-N-SH und SH-SY5Y

Die Abbildung zeigt den Vergleich zwischen unstimulierten und stimulierten SK-N-SH-Zellen und SH-SY5Y-Zellen bezüglich der Expression von CNTN-4 nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels Durchflusszytometrie. *** $p < 0,001$

Auch auf RNA-Ebene kann ein basaler Expressionslevel von CNTN-4 auf beiden Neuroblastomzelllinien nachgewiesen werden. Ein Expressionsanstieg des CNTN-4-Moleküls nach Stimulation lässt sich auf der Zelllinie SK-N-SH nicht nachweisen ($p > 0,05$; Abb. 23).

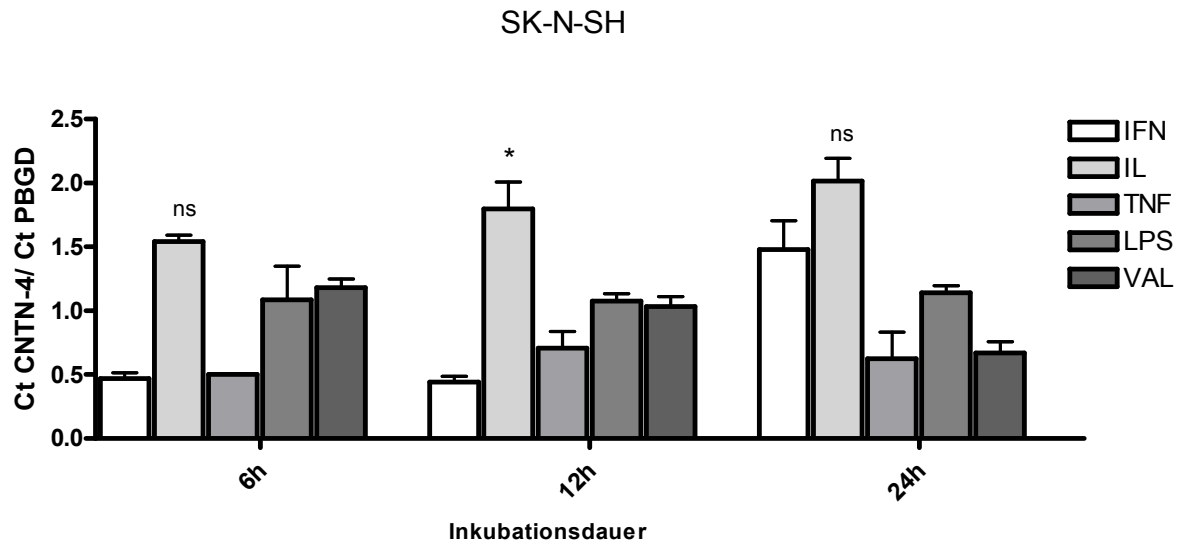


Abbildung 23: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-CNTN-4-Expressionsratio der Zelllinie SK-N-SH
Diese Abbildung zeigt den Verlauf der verschieden stimulierten Zellen der Zelllinie SK-N-SH in Bezug auf ihre Expression des Adhäsionsmoleküls CNTN4 nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten. *** $p < 0,001$

Nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ kommt es bei der Zelllinie SH-SY5Y zu einem signifikanten Expressionsanstieg der CNTN-4-mRNA nach 12 Stunden und 24 Stunden Inkubationsdauer ($p < 0,001$; Abb. 24).

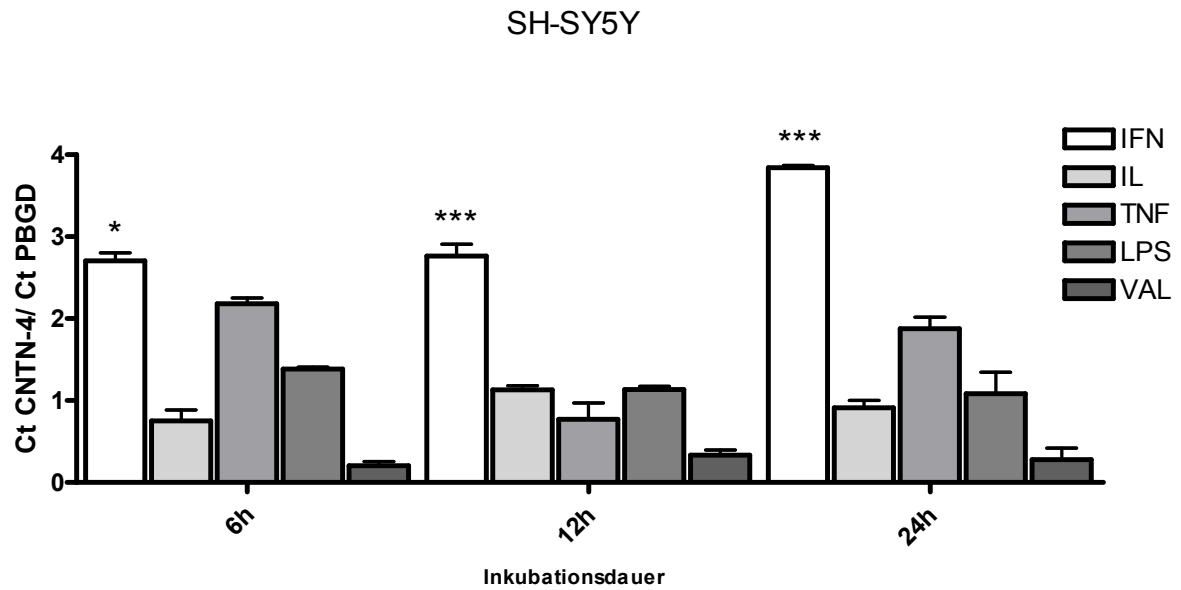


Abbildung 24: Gegen PBGD normalisiertes Expressionsratio von CNTN-4 nach Stimulation der Zelllinie SH-SY5Y

Diese Abbildung zeigt das mRNA-Expressionsratio von CNTN-4 nach Stimulation der Zelllinie SH-SY5Y mit den angegebenen Stimulantien in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in den real time PCR-Versuchsreihe.
 *** $p < 0,001$

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Neuroblastomzelllinien mit proinflammatorischen Zytokinen inkubiert und anschließend die Expression von neuronalen Oberflächenmolekülen auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen. Durch diese imitierte Immunreaktion wurde die Veränderung der neuronalen Oberflächenadhäsionsmoleküle detektiert um mögliche Veränderungen der Signalwege in Neuroblastomen durch eine Immunreaktion nachzuweisen. Das Vorhandensein von Entzündungszellen in Neuroblastomen sowie die Beeinflussung von Neuroblastomen durch Immuntherapie wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Bill et al., 1970; Martin et al., 1968; Seeger, 2011; De Geer et al., 2006). Unser Ziel war nun zum Einen die Überprüfung proinflammatorischer Effekte auf immun-relevante Oberflächenmoleküle von Neuroblastomzellen mit verschiedenen Zytokinen oder einem Histondeacetylasehemmer (Valproat). Im Folgenden werden daher die Ergebnisse nach den Oberflächenmolekülen geordnet diskutiert.

4.1 MHC-I

Einfluss proinflammatorischer Zytokine sowie Valproinsäure auf die Expression von MHC-I im Vergleich mit IFN γ auf Neuroblastomzelllinien

Neuroblastomzellen exprimieren wenig bis kein MHC-I auf ihrer Oberfläche. In einer Studie aus Köln wurden aus einer Gruppe von 68 Neuroblastomen 19 ausgewählt und auf das Vorhandensein von MHC-I untersucht, wobei keiner dieser Tumoren MHC-I positiv war (Wölfl et al., 2005). Der MHC-I-Proteinkomplex spielt eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit den Strategien verschiedener Tumorzellen dem Immunsystem zu entgehen, da vor allem eine Herunterregulierung der Antigen-Expression von MHC-I zu diesen Strategien zählt (Garcia-Lora et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit high-risk Neuroblastomen Stadium 4 eine bessere Überlebenschance hatten wenn noch funktionstüchtige zytotoxische T-Zellen, bei welchen eine Spezifität für das Tumor-Antigen vorlag, vorhanden waren (Coughlin et al., 2006). Weiterhin konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass vor allem bei den Neuroblastomen der charakteristische Mangel an MHC-I-Molekülen einen wichtigen Mechanismus zur Umgehung des Immunsystems bei dieser Tumorart darstellt (Main et al., 1985; Raffaghello et al., 2005). Diese Tatsache macht das Neuroblastom interessant für eine mögliche Immuntherapie, da es während einer Immunreaktion zu einer Veränderung der Expression des MHC-I-Moleküls auf den betroffenen Zellen kommt um eine bessere Erkennung und gegebenenfalls Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen zu ermöglichen. Diese Vorgänge werden maßgeblich durch proinflammatorische Zytokine geregelt, welche im Rahmen einer Entzündungsreaktion vermehrt ausgeschüttet werden. Auch für Neuroblastomzelllinien konnte eine Erhöhung des MHC-I-Expressionslevels nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin Interferon- γ in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden (Ponzoni et al., 1993; Ucar et al., 1995). Dieser Effekt konnte auch *in vivo* nachvollzogen werden (Evans et al., 1989; Reid et al., 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit ging es nun darum den schon bekannten Effekt von Interferon- γ auf die Expression von MHC-I auf Neuroblastomzelllinien erneut zu bestätigen und auf dieser Basis einen Vergleich des Stimulationseffektes von Interferon- γ zu anderen proinflammatorischen Zytokinen sowie dem Histondeacetylasehemmer Valproinsäure anzustellen. Es zeigt sich dabei die deutliche Überlegenheit von Interferon- γ im Vergleich zu allen anderen verwendeten Stimulantien. In der FACS-Analyse wird jedoch auch ein positiver Effekt auf die MHC-I-Expression durch den Histondeacetylasehemmer Valproat deutlich. Der

bekannte antitumoröse Effekt von Valproinsäure (Driever et al., 1999; Cinati et al., 2002; Hrebachova et al., 2010) auf Neuroblastomzelllinien kann allerdings nicht durch die Erhöhung der Expression von MHC-I erklärt werden, da *in vitro* die dazu nötigen Immunzellen fehlen. Allerdings zeigen die nachgewiesenen Effekte dieser Arbeit einen Ansatz für die Wirksamkeit von Valproinsäure und anderen Substanzen *in vivo*, da durch die Erhöhung des MHC-I-Komplexes eine bessere Angreifbarkeit des Tumors durch zytotoxische T-Zellen hervorgerufen werden kann. Diese Ergebnisse werden durch eine italienische Arbeitsgruppe untermauert, die zeigen konnte, dass in Neuroblastomzelllinien durch Wiederherstellung von MHC-I und einer geringen Anzahl von Regulatorproteinen eine Erkennung und Abtötung durch zytotoxische T-Zellen erfolgen kann (Lorenzi et al., 2012). Ein synergistischer Effekt zwischen Interferonen und Valproat, welcher ebenfalls beobachtet wurde, macht eine solche Erklärung weiter wahrscheinlich (Cinatl et al., 2002). Neben den schon gezeigten Wirkungen von Valproinsäure auf Neuroblastomzelllinien wie Reduzierung des Metastasepotentials und Induktion einer Differenzierung in Richtung Neuron wäre nach den hier erbrachten Ergebnissen auch eine bessere Erfassung und Eliminierung durch das Immunsystem mittels Erhöhung des Expressionsniveaus von MHC-I ein weiterer wichtiger Effekt des Valproats (Gu et al., 2012; Shah et al., 2013; Hrebachova et al., 2009; Göttlicher et al., 2001; Cinatl et al., 1997).

Allerdings konnten die FACS-Ergebnisse nicht durch die real time PCR bestätigt werden. Dort zeigt sich auch nach 48h Inkubationsdauer kein Effekt der Valproinsäure auf die Expression von MHC-I.

4.2 ICAM-1 (CD 54)

Stimulationseffekte proinflammatorischer Zytokine auf die Expression des Oberflächenproteins ICAM-1 (CD 54) auf Neuroblastomzelllinien

Ein Effekt proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von ICAM-1 wurde schon in einer anderen Arbeit (Chuluyan et. al., 1998) durch ELISA-Ergebnisse gezeigt. In dieser Arbeit wurden die Zytokine IL-1 α , TNF α und IFN γ bezüglich ihrer Wirkung auf die Expression von ICAM-1 auf den Zelllinien SK-N-MC und SK-N-SH getestet. Es zeigte sich ein Effekt aller drei Zytokine auf die Expression von ICAM-1 der Zelllinie SK-N-SH während die Zelllinie SK-N-MC nur nach Stimulation mit TNF α und IFN γ einen ICAM-1-Expressionsanstieg zeigte. In der hier vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse auf Proteinebene für das Zytokin IFN γ auf der Zelllinie SK-N-SH bestätigt werden, sowie um die Ergebnisse bezüglich der Zytokine IL-1 β , LPS und den Histondeacetylasehemmer Valproat sowie der Zelllinie SH-SY5Y erweitert werden. Zusätzlich untersuchte ich in dieser Studie auch die Situation auf RNA-Ebene mittels der real-time PCR. Hier ließ sich bei Stimulation mit TNF α und IFN γ eine Expressionssteigerung des ICAM-1 in SK-N-SH Zellen zeigen. Im Vergleich zu Chuluyan et al. konnte jedoch in meiner Arbeit kein Effekt des dem IL-1 α in Rezeptorbindung und damit Funktion sehr ähnlichen IL-1 β nachgewiesen werden (Chuluyan et. al., 1998). Dies zeigt sich zudem auf beiden ausgewerteten Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-SH in der FACS-Analyse. Dieses Ergebnis deckt sich mit den auf RNA-Ebene gemessenen Ergebnissen, bei denen sich ebenfalls kein Effekt dieses Zytokins auf die mRNA-Expression von ICAM-1 zeigt. Ein Grund für unterschiedliche Ergebnisse auf einer identischen Zelllinie könnte in der Durchführung unterschiedlicher Methoden liegen, da die Ergebnisse der oben genannten Studie mit ELISA erbracht wurden im Vergleich zu den hier vorliegenden Ergebnissen, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Da bei der ELISA-Methode sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Expression gemessen wird sind die unterschiedlichen Ergebnisse zur FACS-Analyse, welche selektiv die Oberflächenexpression misst, gut erklärbar. Zusätzlich ist ein Unterschied durch die Verwendung anderer Antikörper während der beiden Messverfahren als Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse wahrscheinlich. Eine Untersuchung des Interleukin-1 α bezüglich seiner Wirkung auf die Expression von ICAM-1 wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Interessanterweise zeigen sich in der vorliegenden Arbeit Unterschiede der ICAM-1-Stimulierbarkeit zwischen den beiden Neuroblastomzelllinien. Es zeigt sich auf der Zelllinie

SH-SY5Y ein Expressionsanstieg von ICAM-1 nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ im Vergleich zur Zelllinie SK-N-SH, bei welcher ein Expressionsanstieg unter LPS-Stimulation zu verzeichnen ist. Grund für diese Ergebnisse könnten unterschiedliche Expressionsmuster von Sublinien nach vermehrter Passagierung sein, mit welcher sich auch die Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Stimulierbarkeit ändert. Auch anderen Autoren kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen auf verschiedenen Neuroblastomzelllinien (Kuppner et al., 1990).

Auch bei anderen neuronalen Tumorzelllinien, wie zum Beispiel Gliomzelllinien unterschiedlicher Dignität, konnten positive Stimulationseffekte der Zytokine $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ auf die Expression von ICAM-1 gezeigt werden (Valentiner et al., 2011).

4.3 N-CAM (CD 56)

Stimulationseffekte proinflammatorischer Zytokine sowie des Histondeacetylasehemmers Valproinsäure auf die Expression des Oberflächenmoleküls N-CAM (CD 56)

In der hier vorliegenden Arbeit zeigt sich ein deutlicher Unterschied in dem basalen Expressionsniveau von N-CAM (CD 56) zwischen der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH und der Kontrollzelllinie HEK-293. Die SK-N-SH-Zellen exprimieren auch unstimuliert eine signifikant höhere Anzahl von N-CAM-Molekülen auf ihrer Oberfläche als die HEK-293-Zellen. Besonders deutlich zeigt sich dieser Unterschied in den FACS-Versuchen, in welchen die Expression von N-CAM der unstimulierten SK-N-SH-Zellen um ein 3,5-faches höher ist als die der HEK-Zellen. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren, in deren Arbeit wurde eine nahezu 100%ige Expressionshäufigkeit von N-CAM auf Neuroblastomen gezeigt und CD 56 somit als tumorassoziiertes Antigen bezeichnet (Jensen et al., 2007). Die konstante und starke Expression von N-CAM auf Neuroblastomen wurde dabei als Voraussetzung für Antikörper-basierte Immuntherapien gesehen. Eine weitere Arbeit unterstreicht die hier vorliegenden Ergebnisse zudem für die untersuchten Zelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y bezüglich des hohen Expressionslevels von N-CAM unstimulierter Neuroblastomzellen *in vitro* (Winter et al., 2008).

Andere Autoren (Sonnenfeld et al., 1982) untersuchten die einzelnen Isoformen von N-CAM und zeigten dabei eine Dominanz der Isoform 180kDa bei Neuroblastomen im Vergleich zu anderen neuroektodermalen Tumoren, welche klassischerweise eine große Rolle in der Zellmotilität spielt und damit ein Zusammenhang zwischen dieser Isoform und dem metastatischen Potential undifferenzierter Neuroblastome hergestellt werden kann.

Ein Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die Expression von N-CAM wurde in keiner der hier diskutierten Arbeiten untersucht. Auch wir konnten weder durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen noch durch Stimulation mit dem Histondeacetylasehemmer Valproat einen Effekt auf die Expression von N-CAM auf RNA-Ebene oder Oberflächenexpressionsebene zeigen.

4.4 NGFR (TrkA)

Stimulationseffekte proinflammatorischer Zytokine sowie des Histondeacetylasehemmers Valproat auf die Expression des Oberflächenrezeptors NGFR auf Neuroblastomzelllinien

Die Mehrzahl der Neuroblastome sowie der Neuroblastomzelllinien exprimieren den hochaffinen NGFR-Rezeptor TrkA auf ihrer Oberfläche (Thompson et al., 1989; Marchetti et al., 1987, Spinelli et al., 1982, Stach et al., 1987; Chen et al., 1992). Auch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen dies. Es konnte im Vergleich zur Zelllinie HEK-293, einer Nierenzelllinie, ein signifikant höheres Expressionsniveau des NGFR auf der Zelllinie SK-N-SH in der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Eine chinesische Arbeitsgruppe stellte einen Zusammenhang her zwischen dem Vorhandensein von vergleichsweise hohen Expressionsdichten von NGFR auf Neuroblastomzelllinien und einer Differenzierung in Richtung ausgereifter neuronaler Zelle (Chen et al., 1992). Das Vorhandensein hoher Dichten des Rezeptors in Neuroblastomen führt laut einer weiteren Studie zu einer verstärkten Immunogenität und repräsentiert damit eine Gruppe deutlich niedrig-maligner Neuroblastome, welche die Tendenz haben spontan in Regression zu gehen. Vergesellschaftet ist dieser Effekt mit einer Heraufregulation von MHC-I in TrkA-exprimierenden Zellen (Pajtler et al., 2013). Eine Veränderung der Expression von NGFR ist auch unter diesem Gesichtspunkt interessant. Eine Erhöhung der Rezeptordichte auf der Oberfläche von Neuroblastomen könnte durch eine Ausdifferenzierung der Tumorzellen möglicherweise zu einer gezielteren und damit effektiveren Behandlung führen. Der Nachweis einer durch Interferon- β hervorgerufener Hochregulierung von TrkA humaner SH-SY5Y-Zellen, welcher einer italienischen Arbeitsgruppe gelang, gab Hinweise auf die Regulation dieses Rezeptors durch proinflammatorische Zytokine und damit auf einen neuen Mechanismus der pro-apoptotischen Effekte von IFN- β bei auf NGF ansprechende Zellen (Dedoni et al., 2013). Dieser Effekt konnte leider in unserer Arbeit nicht bestätigt werden, denn hier ergab sich für keines der proinflammatorischen Zytokine ein signifikanter Effekt mit Ausnahme von LPS, welches zu einer geringen Expressionsteigerung des NGFR (TrkA) führte.

Die in der hier vorliegenden Studie gezeigte Heraufregulation der NGF-Rezeptorexpression auf der Oberfläche von Neuroblastomzelllinien durch Valproat war sowohl auf Proteinebene, wie auch auf RNA-Ebene eindeutig nachweisbar. Der Stimulationseffekt von Valproat war auf Proteinebene nach 48 Stunden Inkubationsdauer am deutlichsten sichtbar. Schon andere Arbeiten zeigten einen Effekt von Valproat auf humane neuronale Zellen *in vitro* (Gian et al.,

2009), wobei ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Valproat und NGF hergestellt wurde. Dort zeigte sich ein durch Valproinsäure (0,5 mM) stimulierter und NGF-induzierter neuronaler Auswuchs von Ratten-Phäochromozytom-Zellen. Weiterhin wurde im Zuge dieser Untersuchungen ein Umkehreffekt gesehen, da die eigentlich durch diese Versuche nachzuweisende Blockierung des neuronalen Auswuchses durch VPA durch die Applikation von NGF deutlich abgemildert wurde. Dieser Effekt könnte durch die in der hier vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse einer durch Valproat erhöhten Rezeptordichte von NGFR erklärt werden. Dieser führt nämlich zu einer vermehrten Bindung des zugegebenen NGF an die erhöhte Anzahl von Rezeptoren. Auch eine Arbeit einer Frankfurter Arbeitsgruppe zeigt eine Valproinsäure-induzierte Steigerung der Expression von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen auf Neuroblastomzelllinien (Ciantl et al., 1996).

Der antitumoröse Effekt der Histondeacetylasehemmer wurde schon in vielen Arbeiten gezeigt und reicht von der Hauptwirkung, der transkriptionalen Reaktivierungen von Tumor-Suppressor-Genen zur Hemmung der Tumorangiogenese und Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen (Villar-Garea et al., 2004; Drummond et al., 2005). Auch der spezielle Wirkmechanismus von Valproat in Bezug auf Neuroblastome wurde hinreichend untersucht. Hierbei zeigte sich die Beeinflussung von Enzymkomplexen, die Blockierung des Zellzyklus und die Einleitung der Apoptose (Gu et al., 2012; Shah et al., 2013; Hrebackova et al., 2009; Göttlicher et al., 2001; Ciantl et al., 1997). Eine Arbeit aus einer anderen Frankfurter Gruppe (Driever et al., 1999) zeigt einen neuen Ansatz und nennt zwei weitere wichtige Wirkungen von Valproat in Bezug auf das Wachstum von Neuroblastomen: (1) Der neuronale Auswuchs von Neuroblastomzellen wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Histondeacetylaseinhibitoren inhibiert; (2) VPA führt zu einer Differenzierung dieser unreifen Zellen. Weitere Arbeiten konnten einen synergistischen Effekt von Valproinsäure und Cisplatin oder Interferon- α in der Behandlung von Neuroblastomzellen zeigen (Hrebackova et al., 2010; Michaelis et al., 2004; Ciantl et al., 2002). Aus diesen Ergebnissen kann eine mögliche Kombinationstherapie bei Neuroblastomen mit Interferon- α und Valproat zur Minimierung des Metastasepotentials und Wachstums sowie Reduzierung von Angiogenese und Steigerung der Differenzierung postuliert werden. Zu beachten ist jedoch bei den bisherigen Resultaten, dass es sich um eine Zellstimulierung *in vitro* handelt sowie um Tierversuchsmodelle mit Mäusen.

Der Anti-Tumor-Effekt von Valproinsäure auf Neuroblastome scheint in Zusammenschau der diskutierten Ergebnisse eine Kombination aus den einzelnen Wirkmechanismen zu sein, zu denen auch die Erhöhung der Expression von neuronalen Oberflächenmolekülen gehört.

4.5 CNTN-4 (BIG-2)

Stimulationseffekte proinflammatorischer Zytokine auf die Expression des Oberflächenmoleküls CNTN-4 (BIG-2) auf Neuroblastomzelllinien

Zu dem Oberflächenmolekül CNTN-4 (alias BIG-2) sind bisher nur sehr wenige Publikationen erschienen. Diesen Arbeiten ist jedoch gemeinsam, dass von einer wichtigen Bedeutung des CNTN-4 in Bezug auf die Entstehung, Plastizität und Formbarkeit neuronaler Netzwerke ausgegangen wird (Zeng et al., 2002; Yoshihara et al., 1995). In einer Publikation aus Australien aus dem Jahre 2003 konnten wichtige Erkenntnisse in Bezug auf das Vorkommen von CNTN-4 im Gehirn sowie auf Neuroblastomzelllinien und weiteren Zelllinien des Nervensystems gewonnen werden (Hansford et al., 2003). Deutlich wurde dabei ein Vorkommen von CNTN-4 über alle Regionen des Gehirns, betont im Thalamus, der Amygdala, dem Gyrus paracentralis, dem rechten Kleinhirn und dem Frontal- sowie Paritallappen. Weitaus interessanter war jedoch das Vorhandensein von CNTN-4 auf Neuroblastomzelllinien, unter anderem auch SH-SY5Y, welches im Vergleich zu anderen Zelllinien des Zentralnervensystems deutlich höher war. Diese mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt. Aufbauend auf diese Vorarbeit wurde in der hier vorliegenden Arbeit zunächst erneut der Expressionslevel von CNTN-4 auf zwei unterschiedlichen Neuroblastomzelllinien auf RNA- und Proteinebene untersucht. In beiden Fällen zeigte sich ein eindeutiges Vorhandensein von CNTN-4 auf der Oberfläche der Zelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y. Unter der Annahme, dass CNTN-4 tatsächlich, als ein Anwärter-Gen verantwortlich für die Differenzierung von Neuroblastom-Zellen gesehen werden kann (Hansford et al., 2003), wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Effekt proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von CNTN-4 untersucht. In den dazu durchgeführten FACS-Versuchen zeigte sich auch nach maximaler Inkubationsdauer von 48 Stunden kein eindeutiger Effekt der untersuchten Zytokine sowie des Histondeacetylasehemmers Valproinsäure auf die Expression von CNTN-4. Auf RNA-Ebene wurden die Ergebnisse auf der Zelllinie SK-N-SH bestätigt, welche zuvor schon auf Protein-Ebene gezeigt werden konnten. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der Zelllinie SH-SY5Y in der real-time PCR erhöhte mRNA-Expressionslevel nach Stimulation mit IFN γ nach allen Inkubationszeiten. Dieses Ergebnis findet jedoch kein Pendant auf Proteinebene, es zeigte sich jedoch in der zuvor genannten australischen Studie (Hansford et al., 2003) in den PCR-Analysen das höchste Expressionslevel von CNTN-4 auf der Oberfläche der Zelllinie SH-SY5Y. In der hier

vorliegenden Arbeit zeigt sich entsprechend dazu ebenfalls ein höheres Expressionsniveau von CNTN-4 auf der Zelllinie SH-SY5Y im Vergleich zu SK-N-SH auf RNA-Ebene.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden die durch proinflammatorische Zytokine sowie den Histondeacetylasehemmer Valproat beeinflussbaren neuronalen Oberflächenmoleküle MHC-I, ICAM-1 (CD 54) und NGFR identifiziert. Die Veränderung der Expression dieser Adhäsionsmoleküle bei Immunreaktion gibt einen Einblick in die Veränderung der Signalwege neuronaler Zellen und könnte daher eine wichtige Rolle im Verständnis von Therapieoptionen spielen. Es scheint unter proinflammatorischen Bedingungen eine Entwicklung von Neuroblastomen in Richtung niedrig-maligne Formen zu geben, beispielsweise durch die Heraufregulation von NGFR sowie eine bessere Erkennung und Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen nach Erhöhung der MHC-I-Expression. Insgesamt kommt es durch die Zugabe von proinflammatorischen Zytokinen zu einer deutlichen Beeinflussung der Neuroblastome *in vitro*. Im Zusammenhang mit anderen Arbeiten lässt sich hieraus eine bessere Behandlung durch Immuntherapien bei Neuroblastomen ableiten.

Die Diskussion der Einzelergebnisse macht jedoch die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen deutlich. Der fehlende Effekt des Valproats auf die Expression von MHC-I auf RNA-Ebene könnte durch Verkürzung der Inkubationsdauer nachgewiesen werden. Die ersten positiven Effekte proinflammatorischer Zytokine auf die Regulation von ICAM-1 auf Gliomzellen könnten einen interessanten Ansatz für eine anschließende Arbeit darstellen (Valentiner et. al., 2011). Der deutliche Effekt von Valproat auf die Expression von NGFR gibt ebenfalls Anlass zu weiteren Arbeiten, da es zu diesem Zusammenhang bisher nur eine weitere Arbeit gibt (Qian, 2009). Interessant ist hier vor allem, ob durch die Hochregulierung von NGFR tatsächlich ein antitumöröser Effekt erzielt werden kann, weiterhin sind Dosierung von Valproat und weitere Signalwege der Zelle von besonderem Interesse.

4.6 Methodendiskussion

4.6.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird in der täglichen Laborroutine hauptsächlich zur Bestimmung von Lymphozytensubgruppen oder Identifizierung von Lymphom- oder Leukämiemarkern anhand bestimmter Oberflächenmarker benutzt. Mit dieser Methode sind jedoch eine Vielzahl von weiteren Messungen möglich, wie beispielsweise der Nachweis von intrazellulären Zytokinen, fluoreszenzmarkierte Oberflächenstrukturen oder eine Unterscheidung zwischen toten und lebendigen Zellen mittels Anfärbung mit SYBR Green (Janossy, 2004; Shapiro, 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die FACS-Analyse genutzt um Oberflächenmoleküle auf Neuroblastomzelllinien sichtbar zu machen indem diese zunächst mit einem Antikörper markiert wurden und in einem zweiten Schritt ein weiterer fluoreszenzmarkierter Antikörper zugegeben wurde, welcher an den ersten Antikörper bindet. Diese Methode ähnelt einem Sandwich-ELISA-Verfahren. Zur Eliminierung von Autofluoreszenz und unspezifischen Bindungen durch Fc-Rezeptorbindungen der Antikörper wurde eine Isotyp-Kontrolle bei allen Messungen mitgeführt. Eine Isotyp-Kontrolle ist demnach ein Antikörper des gleichen Isotyps mit jedoch irrelevanter Spezifität. Für die Auswertung der Daten wurde der Wert der Isotyp-Kontrolle dann von den spezifischen Ergebnissen abgezogen. Der so ermittelte MFI-Wert sorgt für eine semiquantitative Darstellung der Messergebnisse.

Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff FITC erfüllt die Ansprüche an einen solchen durch gute Detektierbarkeit mit dem in unserem Labor verwendeten Argonlaser sowie eine hohe Quantenausbeute (Maecker et al., 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden nur monoklonale Antikörper verwendet, da diese im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern durch Reduktion der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz eine höhere Spezifität besitzen. Die Vorteile der Durchflusszytometrie liegen in der schnellen Erlernbarkeit der Methode sowie in der raschen Durchführung der Versuche, da von der Zellernte in der Zellkultur bis zum Ergebnis der Analyse nur etwa 4-6 Stunden je nach Menge der zu untersuchenden Moleküle vergehen.

Eine Problematik der Durchflusszytometrie liegt in der Variation der Ergebnisse verschiedener Labore (Gratama et al., 1998), weshalb in der hier vorliegenden Arbeit zur Vergleichbarkeit der Daten Versuche mit schon bekannten Ergebnissen wiederholt wurden. Der Grund für diese Variationen ist hauptsächlich in der unterschiedlichen

Probenaufbereitung sowie in der Verwendung unterschiedlicher Geräte und damit unterschiedliche Anregungs- und Messlichtstärken zu suchen. Ein weiterer Nachteil der Durchflusszytometrie ist die kostenintensive Beschaffung des Gerätes sowie der zur Messung benötigten Antikörper. Um die Gefahr einzelner Ausreißer zu minimieren wurde jeder Ansatz dreifach durchgeführt und ein entsprechender Mittelwert für die Proben errechnet.

4.6.2 Real time PCR

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine real time PCR der nachzuweisenden Oberflächenmoleküle MHC-I, ICAM-1 (CD 54), N-CAM (CD 56), NGFR und CNTN-4 durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein mRNA-basiertes Nachweisverfahren. Dieses Nachweisverfahren ist in hohem Maße von der Qualität der vorherigen Herstellungsschritte abhängig. Von der Zellgewinnung in der Zellkultur bis zum Ergebnis der real time PCR müssen mehrere Reaktionsschritte durchgeführt werden. Zunächst werden die Zellen zerstört und die RNA isoliert, es folgt die Messung des RNA-Gehaltes sowie die cDNA-Synthese durch die RT-PCR. Die gewonnene cDNA wird dann als Template in die eigentliche real time PCR eingesetzt. Es handelt sich also im Vergleich zur FACS-Analyse um eine arbeitsintensive Methode mit einem Zeitaufwand von 8-10 Stunden, wobei einmal gewonnene cDNA in mehreren real-time PCR-Läufen eingesetzt werden kann. Zudem zeigt sich ein möglicher Pipettierfehler, welcher beispielsweise im Rahmen der cDNA-Synthese unterläuft erst nach Abschluss des entsprechenden PCR-Laufes und führt damit zu Verzögerungen im Ablauf, da die gesamte Zellaufbereitung erneut erfolgen muss.

Kritisch zu sehen ist außerdem, dass die gemessene mRNA-Expression nicht zwangsläufig der Proteinexpression entspricht, weshalb in der Arbeit hier die zusätzliche Messung der Expression der Oberflächenproteine mittels FACS-Analyse erfolgte. In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich jedoch mit wenigen Ausnahmen eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der FACS-Analyse und der real-time PCR.

Die Auswertung der durch die real time PCR gewonnenen Ergebnisse ist als weiterer kritischer Punkt zu sehen, da sie zum einen arbeitsintensiv und zum anderen kompliziert ist. Für eine effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels real time PCR, wie sie in dieser Arbeit erfolgte, sind sehr viele Vorarbeiten nötig. Zunächst muß für die Effizienzangabe jedes Primerpaares eine Standardkurve errechnet werden basierend auf zuvor durchgeführten Verdünnungsreihen von repräsentativen cDNA-Mischproben (Pfaffl et al., 2001). Ausgehend

von dieser Standardkurve lässt sich über die Steigung die Effizienz der PCR beurteilen. Für alle hier gemessenen Marker konnte eine Effizienz von 1,76 bis 2,0 ermittelt werden.

Die relative Quantifizierung erfolgt über die Normalisierung der Expressionsergebnisse anhand eines „Housekeeping Gen’s“ (Livak et al., 2001). In der hier vorliegenden Arbeit wurde PBGD als solches benutzt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte dabei über die $\Delta\Delta CT$ -Methode (genaue Formel ist dem Methodenteil zu entnehmen). Aufgrund dieser Vielzahl verschiedener Rechenwege ist die Gefahr von Übertragungsfehlern deutlich erhöht.

Vorteile der real time PCR liegen in der messgenauen Quantifizierung auch kleiner DNA-Mengen, da es sich bei der real time PCR sowohl um ein sensitives als auch um ein spezifisches Nachweisverfahren handelt. Zudem erfolgt bei dieser Methode die Kontrolle durch die Auswertung der Schmelzkurvenanalyse und damit eine Überprüfung der Spezifität der Primer. Diese zeigt bei allen durchgeführten Messungen einen entsprechenden Peak an der Stelle des spezifischen Produktes. Mögliche Primer-Dimere werden durch weitere Signalanhebungen an anderer Stelle sichtbar. In den hier durchgeführten Messungen waren nur in den Wasserproben Primer-Dimere nachweisbar, nicht jedoch in den eigentlichen Proben.

II. Zusammenfassung

Die Prognose des Neuroblastoms ist hauptsächlich abhängig vom Alter der Patienten bei Erkrankungsbeginn, dem Stadium bei Diagnosestellung sowie der histopathologischen Einteilung. Möglicherweise wird die Prognose des Neuroblastoms auch vom Ausmaß entzündlicher Infiltrate beeinflusst. In dieser Arbeit wurden daher die Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y mit den proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktora (TNF α), Interferon γ (IFN γ) und Lipopolysaccharid (LPS) sowie dem Histondeacetylasehemmer Valproat (VPA) inkubiert und die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Neuroblastomzellen untersucht.

Nach einer Inkubationsdauer von 6h, 12h, 24h und 48h wurden die neuronalen Oberflächenmoleküle MHC-I, N-CAM (CD 56), I-CAM (CD 54), NGFR (TrkA) und CNTN-4 untersucht. Zunächst wurde eine Detektion auf Proteinebene mittels FACS-Analyse durchgeführt, anschließend eine RNA-Untersuchung mit der real-time PCR.

Die Oberflächenexpression von MHC-I ließ sich durch IFN γ signifikant hochregulieren. Auch durch die Stimulation mit VPA und teilweise auch durch TNF α wurde dieser Effekt hervorgerufen, jedoch in deutlich geringerer Ausprägung. IFN γ , TNF- α und LPS führten in unterschiedlichem Maße zu einer Heraufregulierung der Expression von ICAM-1. Die Oberflächenexpression des NGFR wurde durch die Stimulation mit VPA ebenfalls deutlich hochreguliert. Geringe Unterschiede bestanden zwischen den beiden Zelllinien. Das Expressionsniveau der Oberflächenmoleküle N-CAM und CNTN-4 ließ sich durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nicht beeinflussen. Alle Ergebnisse waren sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene nachweisbar.

Die Expression von immunogenen Oberflächenmolekülen der untersuchten Neuroblastomzelllinien und damit die Signalübermittlung in neuronalen Netzwerken ließ sich durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen sowie dem Histondeacetylasehemmer Valproat teilweise beeinflussen. Insbesondere für das Valproat konnte hierbei neben den bekannten antitumorösen Effekten auf Neuroblastomzelllinien durch die Inhibition der Histondeacetylase eine Heraufregulierung der Oberflächenexpression von MHC-I sowie NGFR nachgewiesen werden, was möglicherweise zu einer vermehrten Immunogenität der Neuroblastome führen könnte. Die genaue Bedeutung der nachgewiesenen Effekte auf die Kommunikation innerhalb von Neuroblastomzellverbänden konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

III. Summary

The prognosis of neuroblastoma is primarily dependent on the patient's age and the tumour stage at the beginning of illness as well as the histopathologic classification. Inflammatory infiltrates could have an influence on the prognosis. Therefore, neuroblastoma cell lines SK-N-SH and SH-SY5Y were incubated with the proinflammatory cytokines Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor necrosis factor α (TNF α), Interferon γ (IFN γ) and lipopolisaccharide (LPS) as well as the histone deacetylase inhibitor Valproat (VPA) and the expression of adhesion molecules on the surface of neuroblastoma cells was measured.

After an incubation period of 6h, 12h, 24h and 48h the neuronal surface molecules MHC-I, N-CAM (CD 56), I-CAM-1 (CD 54), NGFR (TrkA) and CNTN-4 were examined. First, detection on the protein level using FACS-Analysis was conducted, then RNA-Examination with the real-time PCR.

Surface expression of MHC-I was significantly up-regulated by IFN γ . This effect, although weaker, was also achieved by stimulation with VPA and TNF α . IFN γ , TNF α and LPS led, in different degrees, to an up regulation of the expression of ICAM-1. The surface expression of NGFR was as well markedly up regulated by stimulation with VPA. Little differences occurred between the two cell lines. The expression level of the surface molecules N-CAM and CNTN-4 was not influenced by the stimulation with proinflammatory cytokines. All results were detectable on the protein level as well as the RNA level.

The expression of adhesion molecules of the examined neuroblastoma cell lines and by that the signal transmission in neuronal networks, were partially affected by the stimulation with proinflammatory cytokines as well as the histone deacetylase inhibitor Valproat. Beside its well-known antitumor effects on neuroblastoma cell lines through the inhibition of histone deacetylase, an up-regulation of the surface expression of MHC-I as well as NGFR may increase the immunogenicity of neuroblastoma.

Literaturverzeichnis

Balkwill FR, Burke F (1989). The cytokine network. *Immunol Today* 10:299-304

Biedler JL, Ross RA, Shanske S, Spengler BA (1980). Human neuroblastoma cytogenetics: search for homogeneously staining regions and double minute chromosomes. In Evans AE, ed. *Advances in neuroblastoma research*. New York, Raven Press 81

Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33(11):2643-52

Bill AH, Morgan A (1970). Evidence for immune reactions to neuroblastoma and future possibilities for investigation. *J Pediatr Surg.* 5(2):111–116

Blackwell TS, Christman JW (1996). Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 77:110-11

Bouillon M, Tessier P, Boulianne R, Destrempe R, AudetteM (1991). Regulation by retinoic acid of ICAM-1 expression on human tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1097:95-102

Bowden CL (2003). Valproat. *Bipolar Disord* 5:189-202

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M et al (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*;224:1121-1124.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F et al (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*;11:1466-1477.

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*224 (4653) 1121-4.

Castleberry RP, Shuster JJ, Smith EI (1994). The Pediatric Oncology Group experience with the international staging system criteria for neuroblastoma. *J Clin Oncol*;12:2378-2381

Chen J, Liu TH (1992). [Gene expressions of NGFR, EGFR, CGA, NPY in 4 neuroblastoma cell lines]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 21(2).69-72

Chesa PG, Rettig WJ, Thomson TM, Old LJ, Melamed MR (1988). Immunohistochemical analysis of nerve growth factor receptor expression in normal and malignant human tissues. *J Histochem Cytochem* 36:383-389

Chuluyan HE, Lang BJ, Yoshimura T, Kenney JS, Issekutz AC (1998). Chemokine production and adhesion molecule expression by neural cells exposed to IL-1, TNF α and interferon γ . *Life Sciences*, Vol. 63, No. 21, pp 1939-1952

Chung IY, Benveniste EN (1990). Tumor necrosis factor- α production by astrocytes: induction by lipopolysaccharide, IFN- γ , and IL-1 β . *J Immunol* 144:2999-3007

Cilenti L, Toniato E, Ruggiero P, Farina AR, Tiberio A, Hayday AC, Gulino A, Frati L, Martinotti S (1995). Transcriptional modulation of the human adhesion molecule gene 1 (ICAM-1) by retinoic acid in melanoma cells. *Exp Cell Res* 218:263-270

Cinatl J Jr, Kotchetkov R, Blaheta R, Driever PH, Vogel JU, Cinatl J (2002). Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int J Oncol* 20(1):97-106

Ciantl J Jr, Ciantl J, Driever PH, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B, Schwabe D (1997). Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 8(10):958-63

Ciantl J Jr, Ciantl J, Scholz M, Driever PH, Henrich D, Kabickova H, Vogel JU, Doerr HW, Kornhuber B (1996). Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 7(7):766-73

Coughlin CM, Fleming MD, Carroll RG, et al. (2006). Immunosurveillance and surviving-specific T-cell immunity in children with high-risk neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 24:5725-34

D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE (1971). Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet*;1:1046-1049.

Davies JA (1995). Mechanism of action of antiepileptic drugs. *Seizure* 4: 267-271

Dedoni S, Olianias MC, Ingianni A, Onali P (2014). Type I interferons up-regulate the expression and signalling of p75 NTR/TrkA receptor complex in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* 79:321-34

De Geer A, Carlson LM, Kogner P, Levitskaya J (2006). Cytotoxic T lymphocytes induce caspase-dependent and –independent cell death in neuroblastoma in a MHC-nonrestricted fashion. *J Immunol* 177:7540-50

Dinareello CA (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508

Driever PH, Knüpfer MM, Cinatl J, Wolff JE (1999). Valproic acid for the treatment of pediatric malignant glioma. *Klin Padiatr* 211(4):323-8

Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC (2005). Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:495-528

Evans AE, Gerson J, Schnauffer L. Spontaneous regression of neuroblastoma (1976). *Natl. Cancer Inst Monogr*;44:49-54

Evans A, Main E, Zier K, Ikegaki N, Tartaglione M, Kennett R, Lampson L (1989). The effects of gamma interferon on the natural killer and tumor cells of children with neuroblastoma. A preliminary report. *Cancer* 1;64(7):1383-7

Evans AE, D'Angio GJ, Propert K et al. Prognostic factors in neuroblastoma (1987). *Cancer*;59:1853-1859.

Fujiwara K, Yoshida A, Ochi M, Yoshioka H, Sawada T, Kusunoki T, Kasubuchi Y (1983). Serum immunoglobulin levels in children receiving valproic acid. *Brain Dev* 5:199

Garcia-Lora A, Algarra I, Collado A, Garrido F (2003). Tumour immunology, vaccination and escape strategies. *Eur J Immunogenet.* 30:177-83

Gian Y, Zheng Y, Tiffany-Castiglioni E (2009). Valproate reversibly reduces neurite outgrowth by human SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 11;1302:21-33

Gilber F, Feder M, Blaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, Rinaldt V, Vinikoor N, Weisband J (1984). Human neuroblastomas and abnormalities of chromosome 1 and 17. *Cancer Res* 44:5444

Goldfeld AE, Strominger JL, Doyle C (1991). Human tumor necrosis factor- α gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *J Exp Med* 174:73-81

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl Z (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20(24):6969-78

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Naim R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36(1):59-74

Gratama JW, D'haucourt JL, Mandy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G, Papa S, Schmitz G, Lenkel R (1998). Flow cytometric quantification of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working group on clinical cell analysis.

Green SH, Rydel RE, Connolly JL, Greene LA (1985). PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor. *J Cell Biol* 102:830-843

Guarini L, Temponi M, Bruce JN, Bollon AP, Duigoogn J, Moulton TA, Ferrone S, Fisher PB (1990). Expression and modulation by cytokine of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in human central nervous system tumor cell cultures. *Int. J. Cancer* 46:1041-1047

Gu S, Tian Y, Chlenski A, Salwen HR, Lu Z, Raj JU, Yang Q (2012). Valproic acid shows a potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. *Anticancer Drugs* 23(10):1054-66

Haas D, Ablin AR, Miller C et al (1988). Complete pathologic maturation and regression of stage IV S neuroblastoma without treatment. *Cancer*;62:818-825.

Hansford LM, Smith SA, Haber M, Norris MD, Cheung B, Marshall GM (2003). Cloning and characterization of the human neural cell adhesion molecule, CNTN4 (alias BIG-2). *Cytogenet Genome Res* 101:17-23

Haskell BE, Stach RW, Werrbac-Perez K, Perez-Polo JR (1987). Effect of retinoic acid on nerve growth factor receptors. *Cell Tissue Res* 247:67

Hrebackova J, Hrabeta J, Eckschlager T (2010). Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. *Curr Drug Targets* 11(3):361-79

Hrebackova J, Polijakova J, Eckschlager T, Hrabeta J, Prochazka P, Smutny S, Stiborova M (2009). Histone deacetylase inhibitors valproate and trichostatin A are toxic to neuroblastoma cells and modulate cytochrome P450 1A1, 1B1 and 3A4 expression in these cells. *Interdiscip Toxicol* 2(3):205-10

Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S (2000). Sodium valproate inhibits production of TNF- α and IL-6 and activation of NF- κ B. *Brain Res* 857:264-251

Jahnke A, Johnson JP (1994). Synergistic activation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by TNF- α and IFN- γ is mediated by p65/p50 and p65/c-rel and interferon-responsive factor STAT1 α (p91) that can be activated by both IFN- γ and IFN- α . *FEBS Lett* 354:220-226

Janeway CA, Travers P (1997). Erkennungs- und Effektormechanismen der adaptiven Immunität. *Imm. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*

Janossy G (2004). Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A* 58:87-97

Jensen LM (1987). Phenotypic differentiation of aphidicolin-selected human neuroblastoma cultures after long-term exposure to nerve growth factor. *Dev Biol* 120:56

Jensen M, Berthold F (2007). Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer. *Cancer Lett.* 258(1):9-21

Johanessen CU (2000). Mechanisms of action of valproate; a commentary. *Neurochem Int* 37:103-110

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986). Expression and structure of the human NGF receptors. *Cell* 47:545-554

Joubert PH, Aucamp AK, Potgieter GM, Verster F (1977). Epilepsy and IgA deficiency- the effect of sodium valproat. S Afr Med J 52:642-644

Kaatsch P, Spix C et al., Daten zum Jahresbericht 2006/2007 des deutschen Krebsregisters

Kuppner MC, Van Meir W, Hamou MF, de Tribolet N (1990). Cytokine regulation of intercellular adhesion molecule- 1 (ICAM-1) expression on human glioblastoma cells. Clin Exp Immunol 81:142-148

Kushner BH, Gilbert F, Helson L (1986). Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and ethologic considerations. Cancer 57:1887-1893

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. Methods 25(4):402-408

Lorenzi S, Forloni M, Cifaldi L, Antonucci C, Citti A, Boldrini R, Pezzullo M, Castellano A, Russo V, van der Bruggen P, Giacomini P, Locatelli F, Fruci D (2012). IRF1 and NF- κ B restore MHC class I-restricted tumor antigen processing and presentation to cytotoxic T cells in aggressive neuroblastoma. PLoS One 7(10):e46928

Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J (2004): Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. Cytometry A 62:169-173

Main EK, Lampson LA, Hart MK, Kornbluth J, Wilson DB (1985). Human neuroblastoma cell lines are susceptible to lysis by natural killer cells but not by cytotoxic T lymphocytes. J Immunol 135:242-46

Marchetti D, Perez-Polo JR (1987). Nerve growth factor receptors in human neuroblastoma cells. J Neurochem 49: 475

Maris JM, Matthay KK (1999). Molecular biology of neuroblastoma. J Clin. Oncol 17(7) 2264-79. Review.

Maris JM, Tonini GP (2000). Genetics of familial neuroblastoma. In: Brodeur Gm, Sawada T, Tsuchida Y et al., eds. Neuroblastoma, First Edition. Amsterdam: Elsevier Science: 125-135.

Martin RF, Beckwith JB (1968). Lymphoid infiltrates in neuroblastomas: their occurrence and prognostic significance. *J Pediatr Surg* 3:161-4

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al (1999). Treatment of high risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation and 13 cis-retinoid acid. *N Engl J Med* 341:1165-1173

Michaelis M, Suhan T, Ciantl J, Driever PH, Ciantl J Jr (2004). Valproic acid and interferon-alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 25(6):1795-9

Miller RW, Young JL, Novakovic B (1994). Childhood Cancer. *Cancer* 75 (suppl. 1); 395-405

Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA (1980). The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 303:622-626

Nathan CF (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:319-326

Pajtlér KW, Rebmann V, Lindemann M, Schulte JH, Stauder M, Leuschner I, Schmid KW, Köhl U, Schramm A, Eggert A (2013). Expression of NTRK1/TrkA affects immunogenicity of neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 15;133(4):908-19

Pandolfi F, Trentin L, Boyle LA, Stamencovic T, Colvin RB, Kunick JT (1992). Expression of adhesion molecules in human melanoma cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor infiltrating lymphocytes. *Cancer* 68:1165-73

Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB et al (2000). Biological variables in the outcome of stage I and II neuroblastomas treated with surgery as primary therapy: a Children's cancer Group study. *J Clin Oncol* 18:18-26

Perosio PM, Brookes JJ (1989). Expression of growth factors and growth factor receptors in soft tissue tumors. Implications for the autocrine hypothesis. *Lab Invest* 60:245-353

Pfaffl MW, Hogeleit M (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 23:275-282

Phiel CJ, Zhang F, Hnang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer and teratogen. *J Biol Chem* 276:36734-36741

Pober JS, Gimbrone MA, Lapierre LA, Mendrik DL, Fiers W, Pothlein R, Springer TA (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137:1893-96

Ponzoni M, Guamaccia F, Corrias MV, Cornaglia-Ferraris P (1993). Uncoordinate induction and differential regulation of HLA class-I and class-II expression by gamma-interferon in differentiating human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 11;55(5):817-23

Queiroz ML, Mullen PW (1992). Effects of sodium valproate on the immune response. *Int J Immunopharmacol* 14:1133-1137

Raffaghello L, Prigione I, Bocca P, et al. (2005). Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications. *Oncogene*. 7;24:4634-44

Reid G, Shan X, Coughlin CM, Lassoued W, Pawel BR, Wexler LH, Thiele CJ, Tsokos M, Pinkus JL, Pinkus GS, Grupp SA, Vonderheide RH (2009). Interferon gamma dependent infiltration of human T cells into neuroblastoma tumors in vivo. *Clin Cancer Res*. 1;15(21):6602-6608

Ries LAG, Smith MA, Gurney JG et al (1999). Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995. Bethesda, MD: National Cancer Institute:71-72

Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. 223:22-38

Rivest S, Torres G, Rivier C (1992). Differential effects of central and peripheral injection of interleukin-1 β on brain *c-fos* expression and neuroendocrine functions. *Brain Res* 587:13-23

Robert E (1982). Valproic acid and spina bifida: A preliminary report-France CDC M.M. W.R. 31:565-566

Robert E, Guibaud P (1982): maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet* 2:937

Robinson PS, Goochee CF (1991). Kidney-specific enzyme expression by human kidney cell lines generated through oncogene transfection. *J Cell Physiol.* 148(1):54-9

Rothlein R, Zaijkowski M, O'Neil MM, Marlin E, Merluzzi VJ (1986). Induction of intercellular adhesion molecule-1 on primary and continuous cell line by pro-inflammatory cytokine. Regulation by pharmacologic agents and neutralising antibodies. *J Immunol* 141:1665-69

Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Imm* 137(4):1270-4

Sadée W, Yu VC, Richards ML, Preis PN, Schwab MR, Brodsky FM, Biedler JL (1987). Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 1;47(19):5207-12

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 29;239(4839):487-91

Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotzky P, Vale W (1987). Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotrophin-releasing factor. *Science* 238:522-524

Scott IG, Akerman KE; Heikkilä JE, Kaila K, Andersson LC (1986). Development of a neural phenotype in differentiating ganglion cell derived human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 128(2):285-92

Seeger RC (2011). Immunology and immunotherapy of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 21:229-37

Shah RD, Jagtap JC, Mruthyunjaya S, Shelke GV, Pujari R, Das G, Shastry P (2013). Sodium valproate potentiates staurosporine-induced apoptosis in neuroblastoma cells via Akt/surviving independently of HDAC inhibition. *Cell Biochem* 114(4):854-63

Shapiro HM (2003): Practical Flow Cytometry, 4th ed. New York, Wiley-Liss.

Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr et al (1984). Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 73:405-416

Shimada H, Stram DO, Chatten J et al (1995). Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst* 87:1470-1476.

Sonnenfeld KH, Ishii DN (1982). Nerve growth factor effects and receptors in cultured human neuroblastoma cell lines. *J Neurosci Res* 8:375

Sonnenfeld KH, Ishii DN (1985). Fast and slow nerve growth factor binding sites in human neuroblastoma and rat pheochromocytoma cell lines: Relationship of sites to each other and to neurite formation. *J Neurosci* 5:1717-28

Spinelli W, Sonnenfeld KH, Ishii DN (1982). Effects of phorbol ester tumor promoters and nerve growth factor on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 42:5067

Stach RW, Lyons CR, Perez-Polo JR (1987). Characteristics of partially purified nerve growth factor receptor. *J Neurochem* 49:1280

Stricter RM, Kunkel SL, Bone RC (1993). Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit. Care Med* 21:447-463

Thompson ST, Schattelman GC, Crown AM, Bothwell M (1989). A monoclonal antibody against nerve growth factor receptor. Immunohistochemical analysis of normal and neoplastic human tissue. *Am J Clin Pathol* 92:415-423

Tumicliiff G (1999). Actions of sodium valproat on the central nervous system. *J Physiol Pharmacol* 50:347-365

Turnbull AV, Pitossi FJ, Lebrun J-J, Lee S, Meltzer JC, Nance DM, del Rey A, Besedovsky HO, Rivier C (1997). Inhibition of tumor necrosis factor- α action within the CNS markedly reduces the plasma adrenocorticotropin response to peripheral inflammation. *J Neurosci* 17:3262-73

Ucar K, Seeger RC, Challita PM, Watanabe CT, Yen TL, Morgan JP, Amado R, Chou E, McCallister T, Barber JR (1995). Sustained cytokine production and immunophenotypic changes in

human neuroblastoma cell lines transduced with a human gamma interferon vector. *Cancer Gene Ther.* 2(3):171-81

Valentiner U, Mühlhoff M, Lehmann U, Hildebrandt H, Schumacher U (2011). Expression of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in human neuroblastoma cell lines. *Int J Oncol.* 39 (2): 417-24

Van Furth R, Cohn ZA (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128:415-422

Villar-Garea A, Esteller M (2004). Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 112(2):171-8

Webb DSA, Mostowski HS, Gerrard TL (1991). Cytokine induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol* 146:3682-86

Whitelaw DM (1966). The intravascular lifespan of monocytes. *Blood* 28:445-464

Wilkinson LS, Edwards JC (1991). Binding of antibodies raised against tumor necrosis factor- α (TNF- α) to blood vessels and macrophages in inflamed synovial tissue. *Rheumatol Int* 11:19-25

Winter C, Pawel B, Seiser E, Zhao H, Raabe E, Wang Q, Judkins AR, Attiyeh E, Maris JM (2008). Neural cell adhesion molecule (NCAM) isoform expression is associated with neuroblastoma differentiation status. *Pediatr Blood Cancer* 51 (1):10-6

Wölfl M, Jungbluth AA, Garrido F, Cabrera T, Meyen-Southard S, Spitz R, Ernestus K, Berthold F (2005). Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 54(4):400-6

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433

Yang L, Froio LM, Scinto TE, Drorah AM, Alon R, Luscinskas FW (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106(2):584-92

Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Nagata S, Kagamiyama H, Mori K (1995). Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1, and F3: four members of an axon-associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J Neurobiol* 28:51-69

Zeng L, Zhang C, Xu J, Ye X, Wu Q, Dai J, Ji C, Gu S, Xie Y, Mao Y (2002). A novel splice variant of the cell adhesion molecule contactin 4 (CNTN4) is mainly expressed in human brain. *J Hum Genet* 47:497-499

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 19;248(450):701-2

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 11;251(5475):547-8

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über Funktion und Sezernierung ausgewählter proinflammatorischer Zytokine (eigene Zeichnung)

Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer durch die real time PCR erstellten Schmelzkurve (Kopie aus LightCycler Software 3.5 einer eigenen Schmelzkurve)

Abbildung 3: Exemplarische Darstellung einer Standardverdünnungsreihe (Kopie aus LightCycler Software 3.5 einer eigenen Standardverdünnungsreihe)

Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer Standardkurve

Abbildung 5: Oberflächenexpression MHC-I der Zelllinien HEK-293, SH-SY5Y und SK-N-SH nach Stimulation mit IFN γ

Abbildung 6: Gegen PBGD normalisiertes MHC-I-mRNA-Expressionsratio nach Stimulation mit IFN γ

Abbildung 7: MHC-I-Expression der Zelllinie SK-N-SH -/+ Stimulation mit verschiedenen Zytokinen nach unterschiedlicher Inkubationsdauer

Abbildung 8: Gegen PBGD normalisiertes MHC-I-mRNA-Expressionslevel der Zelllinie SK-N-SH nach Stimulation mit aufgeführten Zytokinen

Abbildung 9: ICAM-1-Expression nach IFN γ -Stimulation Vergleich der Zelllinien

Abbildung 10: ICAM-1-Expression -/+ Stimulation der Zelllinie SH-SY5Y

Abbildung 11: ICAM-1-Expressionsvergleich nach Stimulation SK-N-SH

Abbildung 12: Zelllinienvergleich des gegen PBGD-normalisierten mRNA-Expressionslevel von ICAM-1 nach IFN γ -Stimulation

Abbildung 13: Gegen PBGD normalisierte ICAM-1-mRNA-Expressionlevel nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Zelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y

Abbildungen 14a und 14b: N-CAM-Expression +/- Stimulation, SK-N-SH und HEK-293 im Vergleich

Abbildung 15: N-CAM-Expression +/- Stimulation der Zelllinie SK-N-SH

Abbildungen 16a und 16b: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-Expressionslevel von N-CAM nach Stimulation der Zelllinie SK-N-SH

Abbildung 17: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-Expressionsratio von N-CAM nach Stimulation

Abbildung 18: NGFR-Expressionslevel +/- Stimulation der Zelllinie SK-N-SH

Abbildung 19: NGFR-Expression nach Valproinsäurestimulation

Abbildung 20: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-NGFR-Expressionslevel nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Zelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y

Abbildung 21: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-Expressionsratio von NGFR nach Valproatstimulation

Abbildung 22: CNTN-4-Expressionsniveau +/- Stimulation, SK-N-SH und SH-SY5Y

Abbildung 23: Gegen PBGD normalisiertes mRNA-CNTN4-Expressionsratio der Zelllinie SK-N-SH

Abbildung 24: Gegen PBGD normalisiertes Expressionsratio von CNTN4 nach Stimulation der Zelllinie SH-SY5Y

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung des Neuroblastoms (nach Brodeur et al, 1993)

Tabelle 2: Herstellerverzeichnis und eingesetzte Konzentrationen der Stimulantien

Tabelle 3: Verzeichnis der eingesetzten Primer mit Sequenzen, Annealingtemperaturen, Zyklusanzahl und Fragmentgröße

Tabelle 4: Aufführung der einzelnen real-time PCR-Bedingungen mit Dauer und Temperatur

Tabelle 5: Effizienzen der einzelnen Primer

Tabelle 6: Berechnungsratio der real-time PCR Ergebnisse über die Effizienzen

Tabelle 7: Antikörperverzeichnis mit Spezifität, Isolation und Hersteller

Abkürzungsverzeichnis

N-CAM	neural cell adhesion molecule
ICAM	intercellular adhesion molecule
NGFR	nerve growth factor receptor
CNTN-4	Contactin-4
MHC-I	Major histocompatibility complex class NF-NF-
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated b-cells
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
IL-1 β	Interleukin-1 β
IFN γ	Interferon γ
LPS	Lipopolysaccharide
LBP	lipopolysaccharid binding protein
VPA	Valproinsäure/ Valproat
RNA	ribonukleinsäure
DNA	desoxyribonukleinsäure
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcriptase- PCR
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
E	Effizienz
FSC	Vorwärtsstreulicht
SSC	Seitwärtsstreulicht
FACS	Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein isothiocyanate
ROI	region of interest
MFI	mean fluorescence intensity
IL-1 α	Interleukin-1 α
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IFN- β	Interferon β
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
NGF	nerve growth factor

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst meinen herzlichen Dank an meinen Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Blaes für die Einarbeitung in die Thematik und die Geduld bei den häufigen Korrekturen.

Herrn Prof. Dr. med. Kaps danke ich für den zur Verfügung gestellten Laborarbeitsplatzes und der Ermöglichung meiner Dissertation.

Für die langwierige und intensive Einarbeitung in die Zellkultur und die Methoden sowie die gute Betreuung während der gesamten Doktorarbeit danke ich sehr herzlich Nina Kneifel, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Auch die MTAs des Liquorlabors haben mir immer wieder unter die Arme gegriffen, mich aufgebaut und unterstützt, auch dafür herzlichen Dank.

Meiner Kollegin und Freundin Dr. med. Regina Hofmann, die mich bei der Einarbeitung in die real time PCR tatkräftig unterstützt hat und mir auch bei allen anderen Fragen zur Seite gestanden hat, gilt ebenfalls mein Dank.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Kollegen Dr. med. Dirk Schulz und Dr. med. Frederic Wanis, die meine Arbeit Korrektur gelesen und mich bei den Übersetzungen unterstützt haben.

Auch meinem Chef, Prof. Dr. med. Uhl möchte ich an dieser Stelle herzlich danken für das stetige Vorantreiben meiner Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und ganz besonders meinem Mann danken für die jahrelange Unterstützung und Geduld, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

I. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den

Katharina Graf



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6402-0



9 783835 196402 0

Photo cover: © anson tsui @ fotolia.de